Série A, nº 4396
Nº d'ordre :
5245

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

FRANÇOISE DIETERLEN-LIÈVRE

1re **THÈSE.** — ÉTUDE MORPHOLOGIQUE ET EXPÉRIMENTALE DE LA DIFFÉRENCIATION DU PANCRÉAS CHEZ L'EMBRYON DE POULET.

2e **THÈSE.** — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 11 mars 1965 devant la Commission d'examen.

MM. THOMAS..... *Président.*
WOLFF ..... } *Examinateurs.*
COUTEAUX..... }

PARIS

Éditions du Bulletin Biologique de la France et de la Belgique
105, Boulevard Raspail

1965

Série A, n° 4396
N° d'ordre :
5245

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

FRANÇOISE **DIETERLEN-LIÈVRE**

1re **THÈSE.** — ÉTUDE MORPHOLOGIQUE ET EXPÉRIMENTALE DE LA DIFFÉRENCIATION DU PANCRÉAS CHEZ L'EMBRYON DE POULET.

2e **THÈSE.** — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 11 mars 1965 devant la Commission d'examen.

MM. THOMAS..... *Président.*
WOLFF ..... } *Examinateurs.*
COUTEAUX..... }

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

PARIS

Éditions du Bulletin Biologique de la France et de la Belgique
105, Boulevard Raspail

1965

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen ..... M ZAMANSKY.

PROFESSEURS

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées.
GRASSÉ	T	Évolution des êtres organisés.
PRÉVOST	T	Chimie organique.
WYART	T	Minéralogie et Cristallographie.
TEISSIER	T	Zoologie.
MANGENOT	T	Biologie végétale (Orsay).
P. AUGER	T	Physique quantique et Relativité.
MONNIER	T	Physiologie générale.
PIVETEAU	T	Paléontologie.
ROCARD	T	Physique (E.N.S.).
H. CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.)
LAFFITTE	T	Chimie générale.
FAVARD	T	Géométrie supérieure.
COULOMB	T	Physique du Globe.
M^lle COUSIN	T	Biologie animale (S.P.C.N.).
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale.
P. DRACH	T	Zoologie.
KASTLER	T	Physique (E.N.S.).
EPHRUSSI	T	Génétique.
RIVIÈRE	T	Géologie S.P.C.N. et sédim. (Orsay).
GAUTHERET	T	Biologie vég. (P.C.B.).
R. LUCAS	T	Recherches physiques.
A. THOMAS	T	Biologie cellulaire.
ARNULF	T	Optique appliquée.
MAX MORAND	T	Physique. Enseignement.
SOLEILLET	T	Physique (P.C.B.).
FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides.
PETIT	T	Biologie maritime.
QUENEY	T	Météorologie et dynamique atmosphérique.
GALLIEN	T	Embryologie.
EICHHORN	T	Botanique.
DE CUGNAC	T	Biologie végétale (S.P.C.N.).
M^lle CAUCHOIS	T	Chimie physique.
THELLIER	T	Physique du Globe
L'HÉRITIER	T	Biologie générale (Orsay)
GRIVET	T	Radioélectricité (Orsay).
PONCIN	T	Mécanique générale.
DUBREIL	T	Arithmétique et théorie des nombres.
QUELET	T	Chimie organique.
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée.
CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire.
CUVILLIER	T	Micropaléontologie.
JUNG	T	Géologie.
TRILLAT	T	Microscopie et diffraction électronique.
WIEMANN	T	Chimie org. et structurale.
JACQUINOT	T	Spectroscopie et physique céleste (Orsay).
VASSY	T	Physique de l'atmosphère.
DESTOUCHES	T	Théories physiques.
AMIEL	T	Chimie générale.
HOCART	T	Minéralogie et Cristallographie.
J.-P. MATHIEU ...	T	Physique (Optique).
COUTEAUX	T	Cytologie.
MAY	T	Zoologie (Orsay).
CHOQUET	T	Théorie des fonctions et Topologie.
FELDMANN	T	Biologie végét. marine.
GUINIER	T	Physique des solides (Orsay).
JOST	T	Physiologie comparée.
FORTET	T	Calcul des Probabilités et Physique mathém.
SCHWARTZ	T	Calcul différentiel et intégral.
CHOUARD	T	Physiologie végétale.
MALAVARD	T	Aviation (Techn. Aéronautique).
BRELOT	T	Calcul diff. et intégral
NORMANT	T	Synthèse organique.
BÉNARD	T	Chimie minérale.
BUVAT	T	Botanique (E.N.S.).
DUGUÉ	T	Statistiques mathématiques.
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie.
ULRICH	T	Physiologie végétale appliquée.
MARÉCHAL	T	Optique théorique et appliquée.
KIRRMANN	T	Théories chimiques.
CHADEFAUD	T	Botanique.
M^lle LE BRETON ..	T	Physiologie de la Nutrit.
LELONG	T	Applic. de l'analyse à la Géométrie.
DEVILLERS	T	Anatomie et Histologie comparées.
EHRESMANN	T	Topologie algébrique.
FRANÇON	T	Physique (S.P.C.N.)
GLANGEAUD	T	Géographie physique et Géologie.
GODEMENT	T	Mathémat. (M.G.P.).
PISOT	T	Tech. mathém. de la Physique.
E. ROCH	T	Géologie.
SCHATZMANN	T	Astrophysique.
TERMIER	T	Géologie générale.
ZAMANSKY	T	Mathématiques générales.
LENNUIER	T	Physique (M.G.P.).
RIZET	T	Génétique (Orsay).
ROUTHIER	T	Géologie appliquée.
M^me TONNELAT	T	Physique théorique.
DIXMIER	T	Mathématiques (M.P.C.).
SOUCHAY	T	Chimie générale.
AIGRAIN	T	Électrotechn. générale.
BRUSSET	T	Chimie systématique.
M. LEVY	T	Physique théorique des hautes énergies (Orsay).
M^me CHAIX	T	Chimie biologique.
M^me HUREL-PY ...	T	Biologie végétale (P.C.B.).
PIAUX	T	Chimie (M.P.C.).
BRUN	T	Mécan. théorique des Fluides.

PROFESSEURS *(suite)*

Lederer	T	Chimie biologique (Orsay).
Mme Dubreil	T	Mathématiques (Agrég.).
Mme Lelong	T	Mathématiques II (E.N.S.).
Bellair	T	Géologie (S.P.C.N.).
Cotte	T	Physique électricité.
J. E. Dubois	T	Chimie organique.
Lamotte	T	Zoologie (E.N.S.).
André Michel ...	T	Chimie minérale (Orsay).
Olmer	T	Énergétique générale.
Rouault	T	Électricité (Orsay).
Gauthier	T	Mécanique appliquée.
Barchewitz	T	Chimie physique.
Brossel	T	Physique atomique.
Buser	T	Physiologie comparée.
Camus	T	Physiologie vég. (Orsay).
Castaing	T	Physique II thermod. (Orsay).
Curien	T	Minéralogie et cristallographie.
Moyse	T	Physiol. vég. (Orsay).
Noirot	T	Évolution des Êtres Org.
Pannetier	T	Chimie générale.
Possompes	T	Zoologie.
Pullmann	T	Chimie quantique
Teillac	T	Phys. nucl. et Radioactivité (Orsay).
Tonnelat	T	Biologie physico - chimique (Orsay).
Ville	T	Économétrie.
Willemart	T	Chimie (P.C.B.).
Dodé	T	Chimie (Orsay).
Freymann	T	Recherches physiques.
Guinochet	T	Biol. vég. (S.P.C.N.) (Orsay).
Rollet	T	Chimie minérale.
Mlle Josien	T	Chimie (S.P.C.N.).
Chevalley	T	Géométrie algébrique et Théorie des groupes.
Arnoult	T	Électronique (Orsay)
Chapelle	T	Physique I (Orsay).
Delange	T	Mathématiques I (Orsay).
Deny	T	Mathématiques générales (Orsay).
Germain	T	Mécanique théorique de fluides.
G. Lucas	T	Géologie.
Allard	T	Chimie physique.
Berthelot	T	Physique des particules fond (Orsay).
Bricard	T	Météorologie et phys. de l'Atmosphère.
Mme Albe-Fessard.	T	Psycho-physiologie.
Friedel	T	Physique des Solides (Orsay).
M. Julia	T	Études des Moléculaires complexes.
Lenden	T	Biologie animale (S.P.C.N.) (Orsay).
Magat	T	Physicochimie des Radioéléments.
Mlle Quintin	T	Électrochimie.
Monod	T	Chimie du Métabolisme.
Benoit	T	Physiologie animale (Orsay).
De Possel	T	Analyse numérique.
Charlot	T	Chimie analytique.
Lemée	T	Écologie vég. (Orsay).
Guérin	T	Chimie (M.P.C.) (Orsay)
M. Chatelet	T	Chimie (P.C.B.).
Jean	T	Physique nucléaire (Orsay).
Mattler	T	Physique (S.P.C.N.).
Bergerard	T	Zoologie (Orsay).
Bertein	T	Électronique (Orsay)
Bouissières	T	Radiochimie.
Mme Couture	T	Thermodynamique et Méc. physique.
Ellenberger	T	Géologie des grandes régions du globe.
Franc	T	Biologie animale (P.C.B.)
Schnell		Botanique tropicale.
Stolkowski		Physiologie végétale.
Acher		Chimie biologique.
Baudoin		Biologie anim. (P.C.B.).
Beaumont		Biolog. anim. (S.P.C.N.).
Blamont	T	Géophysique Ionosphère.
Bourreau	T	Botanique.
D. Curie		Physique (M.G.P.).
Durand-Delga ...	T	Géologie.
Fréon	T	Chimie organique (Orsay).
Heller	T	Physiologie végétale.
Tortrat	T	Calcul des Probabilités.
Cailleux	T	Géologie (S.P.C.N.).
Magnan	T	Physique (S.P.C.N.).
Daudel	T	Mécanique ondulatoire appl. à la Chim. théor. et à la Phys. nucléaire.
Mlle Fourgnoy ...	T	Biologie végétale (S.P.C.N.).
Mme Choquet-Bruhat...	T	Méc. analytique et Méc. céleste.
Mlle Veil	T	Physiologie générale.
Lwoff	T	Microbiologie.
Siestrunck	T	Mécanique physique et expérimentale.
Lacombe	T	Métallurg. des métaux nucl. (Orsay).
Brochard	T	Physique (P.C.B.) (Orsay).
Cabannes	T	Mécanique générale.
Lesieur	T	Mathématiques I (Orsay).
Mazet	T	Mécanique générale (Orsay).
Caire		Géographie phys. et Géologie dynamique.
Comolet	T	Mécanique des Fluides.
Corabœuf	T	Physiologie animale (Orsay).
Delloue		Physique de l'Exosphère.
Gorenflot		Botanique II (Orsay).
Houillon		Biol. animale (P.C.B.).
J. Jullien		Chimie (S.P.C.N.) (Orsay).
Malgrange	T	Tech. math. de la Phys. (Orsay).
Olivier		Anthropologie.
Nozeran	T	Botanique II (Orsay).
Blanc-Lapierre ..	T	Physique (E.N.S.) (Orsay).
Chevaugeon	T	Potanique (Orsay).
Kahane	T	Mathématiques (Orsay).
Samuel	T	Math. (E.N.S. féminine)
Kourganoff	T	Astronomie (Orsay).
Thiry	T	Mécanique céleste.
Abeles		Physique (S.P.C.N.).
Amat	T	Physique (P.C.B.).
Auboin	T	Géologie.
Mme Benoit - Gueutal	T	Physique nucl. et radioactivité (Orsay).
Bougis		Biologie marine (Villefranche/Mer).
Bruhat	T	Mathématiques (M.P.C.).
Brunn	T	Géologie historique (Orsay).
Chabbal	T	Physique (M.G.P.) (Orsay).
Deheuvels	T	Mathématique propé.
D'Espagnat	T	Physique théorique (Orsay).

PROFESSEURS *(suite)*

Furon	T	Géologie (S.P.C.N.).
Mme Gans	T	Génétique.
Geneves	T	Biologie végétale (P.C.B.).
Guilbert		Physique (C.U.S., Orléans).
Hupe	T	Pétrographie.
Hollande	T	Biologie générale.
Lions	T	Analyse numérique.
Maitte	T	Chimie (P.C.B.).
Meyer		Physique propédeutique.
Nicolas		Géologie appliquée.
Panigel		Biologie générale.
Ravier		Pétrographie.
Roseau	T	Mécanique théoriq. des fluides.
Roubine	T	Électronique.
Silber	T	Chimie (P.C.B.).
Uebersfeld	T	Électronique.
Yvon	T	Théories physiques.
Hervé	T	Mathématiques.
Néron	T	Mathémat. (M.P.C.) (Orsay).
Mme Pecker-Wimel	T	Astrophysique.
Balkansky		Physique (M.P.C.).
Le Corre	T	Électricité.
Delcroix	T	Physique théorique (Orsay).
Gourdin		Phys. théor. des hautes énergies (Orsay).
Lehmann	T	Phys. exp. des hautes énergies (Orsay).
Nataf	T	Physique nucléaire et radioactivité (Orsay).
Échalier		Biologie animale (P.C.B.).
Barraud		Physiologie cellulaire.
Lioret		Physiologie végét. (Orsay).
Dars		Géologie struct. et Géol. appliquée.
Camefort	T	Botanique (agrégation).
Vichniewsky	T	Mécanique industrielle.
Elaquière		Électronique (Orsay).
Arnous	T	Physique théorique.
Tatibouet		Chimie (C.S.U., Orléans).
Malliavin	T	Mathématique propé. (Orsay).
Gaudemar		Chimie propéd.
Perez y Jorba ...		Phys. exp. des hautes énergies (Orsay).
David	T	Chimie (Agrég., Orsay)
Brousse	T	Mécanique théorique

Secrétaire Général .... R. Poullain

Françoise DIETERLEN-LIÈVRE

ÉTUDE MORPHOLOGIQUE ET EXPÉRIMENTALE DE LA DIFFÉRENCIATION DU PANCRÉAS CHEZ L'EMBRYON DE POULET

SOMMAIRE

Pages

INTRODUCTION 5

PREMIÈRE PARTIE. — LES ÉTAPES DE L'ORGANOGENÈSE DU PANCRÉAS CHEZ L'EMBRYON DE POULET

HISTORIQUE 8

MATÉRIEL ET MÉTHODES 9

I. — *Formation de l'ébauche pancréatique dorsale chez l'embryon de 3 jours* 10

II. — *Différenciation des ébauches ventrales chez l'embryon de 4 jours* . 12

III. — *Apparition des tubules primitifs chez l'embryon de 5 jours* . . 16

IV. — *Fusion des ébauches et première identification des îlots chez l'embryon de 6 jours* 18

V. — *Différenciation massive des granulations α chez l'embryon de 7 jours* 20

VI. — *Croissance des tubules primitifs, présence inconstante de granulations β, différenciation de pseudo-éosinophiles à partir de 8 à 9 jours d'incubation* 21

VII. — *Différenciation du tissu exocrine pendant la deuxième moitié de l'incubation* 24

VIII. — *Le pancréas à la fin de l'incubation* 26

DISCUSSION 27

DEUXIÈME PARTIE. — LA DIFFÉRENCIATION ULTRASTRUCTURALE DES TYPES CELLULAIRES DU PANCRÉAS EMBRYONNAIRE

INTRODUCTION 30

MÉTHODES 31

CHAPITRE PREMIER. — LES TYPES CELLULAIRES DU PANCRÉAS DIFFÉRENCIÉ. .

I. — *La cellule acineuse et les cellules annexes du tissu exocrine* . . 31

a) La cellule acineuse 31

b) La cellule centro-acineuse 35

c) La cellule canaliculaire 35

Pages

II. — *Le pseudo-éosinophile* 35
III. — *La cellule A* 37
IV. — *La cellule B* 38
V. — *Les cellules mixtes* 41

CHAPITRE II. — DIFFÉRENCIATION DES TYPES CELLULAIRES CHEZ L'EMBRYON. .

I. — *La différenciation du tissu exocrine* 45
II. — *La différenciation du tissu endocrine A* 47
III. — *La différenciation du tissu endocrine B* 60

DISCUSSION 66

TROISIÈME PARTIE. — INFLUENCE DU PANCRÉAS EMBRYONNAIRE SUR LE GLYCOGÈNE HÉPATIQUE EN PARABIOSE *IN VITRO*

INTRODUCTION 72

MÉTHODES 73

CHAPITRE PREMIER. — CULTURE DU PANCRÉAS *IN VITRO* 75

HISTORIQUE 75

I. — *Évolution de la différenciation insulaire* 76
II. — *Évolution des tubules primitifs et relations épithélium-mésenchyme* 77

CHAPITRE II. — LE GLYCOGÈNE HÉPATIQUE EN CULTURE ORGANOTYPIQUE . . 80

CHAPITRE III. — ASSOCIATIONS PANCRÉAS-FOIE *IN VITRO* 83

A. — *Influence du pancréas de 14 jours sur le foie de 6 jours* 84
B. — *Influence du pancréas de 10 jours sur le foie de 6 jours* 88
C. — *Influence du pancréas de 8 jours sur le glycogène hépatique et diffusion de l'effet dans le milieu de culture* 90
D. — *Influence du pancréas entier de 5 jours, 6 jours et 7 jours sur le glycogène hépatique* 92
E. — *Influence du pancréas de 4 jours sur le glycogène hépatique* . . . 95
F. — *Influence de l'ébauche pancréatique dorsale de l'embryon de 3 jours sur le glycogène hépatique* 97

DISCUSSION 99

CONCLUSIONS GÉNÉRALES 107

RÉSUMÉ 109

BIBLIOGRAPHIE 112

Je suis heureuse de dire ici ma profonde gratitude envers mon maître, M. le Professeur Étienne Wolff qui m'a accueillie dans son laboratoire du Collège de France et qui m'a suggéré le sujet de ce travail. Par son enseignement de tous les jours au laboratoire, comme par son enseignement

magistral, il m'a ouvert l'esprit aux problèmes de l'embryologie et m'a initiée à ses techniques. Tout en cherchant à m'inculquer la persévérance et la nécessité de l'esprit critique, il m'a accordé une confiance chaleureuse qui m'a été d'un grand secours dans mon travail. Je le remercie encore de m'avoir fait l'honneur de m'accepter parmi ses élèves.

M. le Professeur J.-A. Thomas suit mon travail depuis de nombreuses années et m'a toujours manifesté un intérêt bienveillant. J'aimerais lui dire ici combien ses conseils et ses encouragements m'ont été précieux. Je lui en exprime ma grande gratitude et le remercie très vivement d'avoir bien voulu présider le jury de ma thèse.

Je suis particulièrement reconnaissante à M. le Professeur R. Couteaux d'avoir accepter de participer à mon jury de thèse me manifestant une confiance et une bienveillance dont j'ai été vivement touchée. Je l'en remercie très sincèrement.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à M. le Professeur P.-P. Grassé. M. Grassé a bien voulu me recevoir dans son laboratoire pendant deux ans et m'a initiée aux techniques de la Microscopie électronique. Chez lui j'ai réalisé une partie de mon travail dans ce domaine.

Je remercie vivement Mlle Cuminge, Mme Paris, M. Coltey et M. Louis, ainsi que mes collègues, chercheurs et techniciens du laboratoire dont l'aide amicale m'a été précieuse.

INTRODUCTION

Bien que le pancréas de l'embryon de Poulet ait suscité depuis quelques années un certain nombre de recherches, les données qui concernent la naissance de la différenciation endocrine sont encore fragmentaires.

On sait que le pancréas des Oiseaux granivores présente une anatomie particulière et que les deux hormones pancréatiques, insuline et glucagon, régissent le métabolisme des sucres suivant des lois bien différentes de celles des Mammifères. Du point de vue anatomique, Gianelli (1902, 1908) trouve que le segment splénique du pancréas est spécialement riche en tissu insulaire chez certains Oiseaux. Clara montre, en 1924, que les affinités tinctoriales permettent de distinguer deux types d'îlots dans le segment splénique chez des Oiseaux variés : des îlots clairs, analogues à ceux des Mammifères, et des îlots sombres, dont les cellules prennent fortement l'hématoxyline ferrique et l'azocarmin. L'existence de ces deux types d'îlots est confirmée par Benazzi-Lentati (1930, 1933, 1934). En 1939, Nagelschmidt identifie les cellules des îlots clairs aux cellules B des Mammifères, tandis que les cellules des îlots sombres correspondent aux cellules A. Van Campenhout et Cornelis (1953) précisent que, chez le Canard, le Poulet et le Pigeon, les grands îlots du segment splénique présentent bien les affinités tinctoriales des cellules A à une exception

près : ces cellules ne se colorent pas par les méthodes d'imprégnation argentique, alors qu'il existe dans les acini un petit nombre de cellules argyrophiles qui seraient des cellules insulaires potentielles. HELLMAN et HELLERSTRÖM (1960) arrivent par une technique d'imprégnation différente à colorer par l'argent certaines cellules des îlots sombres localisées le long des capillaires ; par ailleurs, on distingue aussi, chez les Mammifères, deux types de cellules A suivant qu'elles se colorent ou non par l'argent. Quelle que puisse être la signification physiologique de ces deux types de cellules, il est admis que les grands îlots du segment splénique des Oiseaux sont constitués de cellules A, et les petits îlots distribués dans l'ensemble de la glande de cellules B.

Du point de vue physiologique, à l'abondance des cellules A correspond la richesse du pancréas en glucagon, ou facteur hyperglycémiant glycogénolytique : VUYLSTEKE et DE DUVE (1953) ont montré que le pancréas aviaire est dix fois plus riche en glucagon que celui des Mammifères. Cette correspondance constitue un des nombreux arguments qui permettent d'attribuer l'élaboration du glucagon aux cellules endocrines A ; on sait d'autre part que les cellules B produisent l'insuline.

Le métabolisme glucidique des Oiseaux présente également des particularités spécifiques ; l'ablation du pancréas, lorsqu'elle est réellement complète, provoque une hypoglycémie rapidement mortelle (MIAHLE, 1958) ; c'est donc la privation de glucagon qui affecte le métabolisme de manière prépondérante ; chez les Mammifères, au contraire, la privation d'insuline qui résulte de la pancréatectomie entraîne le diabète.

Nous nous sommes intéressée plus particulièrement au développement des fonctions endocrines du pancréas chez l'embryon de Poulet ; ces activités sont susceptibles de jouer un rôle dans la physiologie embryonnaire. Accessoirement l'étude de la différenciation du pancréas nous a conduit à certaines observations sur la différenciation de la glande exocrine.

Les données actuelles qui concernent le pancréas embryonnaire sont de deux ordres :

1° des données histologiques ; l'historique en sera fait au chapitre I et montrera que l'étude histogénétique des cellules insulaires chez l'embryon est difficile et imprécise ; elle ne livre que des renseignements indicatifs sur la différenciation cytologique ; cette étude constitue néanmoins la base nécessaire à une analyse plus approfondie par d'autres méthodes et sera reprise dans la première partie de ce travail ;

2° des données physiologiques ; elles ont été obtenues par différents auteurs grâce à des dosages biologiques dans des extraits de pancréas et à des interventions expérimentales sur l'embryon.

Ces techniques, transposées de l'adulte à l'embryon, ont révélé la présence d'hormones dans le pancréas de l'embryon de 12 à 13 jours. Or à ce stade le pancréas a déjà subi une grande partie de son organogénèse et il est intéressant de détecter les processus intracellulaires antérieurs à

ce stade qui aboutissent à une élaboration hormonale décelable par les méthodes biochimiques.

Aussi avons nous cherché à préciser la différenciation du pancréas endocrine embryonnaire par deux méthodes : d'une part, par l'étude au microscope électronique de la glande à différents stades de développement ; d'autre part, par l'étude de l'influence du pancréas sur un autre organe embryonnaire.

Le plan de ce travail est donc le suivant :

1. — Les étapes de l'organogenèse du pancréas.
2. — La différenciation ultrastructurale des types cellulaires.
3. — L'influence du pancréas embryonnaire sur le glycogène du foie, lorsque les deux organes, isolés de l'organisme, sont associés *in vitro*.

PREMIÈRE PARTIE

LES ÉTAPES DE L'ORGANOGENÈSE DU PANCRÉAS CHEZ L'EMBRYON DE POULET

HISTORIQUE

L'histoire des connaissances sur le développement du pancréas chez l'embryon de Poulet suit avec un certain retard celle des connaissances sur le pancréas adulte ou embryonnaire des Mammifères. On peut y distinguer trois phases distinctes.

1° Pendant la première période on a décrit l'organogenèse générale des ébauches pancréatiques. Pour Remak (1854) le pancréas provient d'une évagination dorsale unique de l'intestin. Puis Göette (1867) décrit une deuxième ébauche ou « pancréas accessoire » qui apparaîtrait au sixième jour d'incubation. En 1892, Félix, puis Saint-Rémy en 1893 décrivent les trois ébauches du pancréas, une dorsale et deux ventrales, expliquant ainsi l'existence de trois canaux excréteurs dans l'organe adulte. Saint-Rémy, puis Brouha (1898) et Choronschitzky (1900) décrivent l'apparition successive des ébauches, leur fusion et les mouvements de torsion de l'intestin qui aboutissent à l'établissement des relations de position définitives entre les différentes branches du pancréas, les canaux excréteurs pancréatiques et les canaux hépatiques.

2° Pendant la deuxième période on signale la présence des îlots endocrines dans le pancréas de l'embryon d'Oiseau. A Siwe (1927) revient le mérite d'avoir décrit l'isolement précoce des îlots dans l'ébauche dorsale chez l'embryon de 60 heures. Potvin et Aron (1927) décrivent la présence, à partir du huitième jour de l'incubation, de deux types d'îlots qu'ils interprètent, selon la théorie de Laguesse, les uns comme les îlots définitifs, les autres comme des îlots embryonnaires transitoires. Benazzi-Lentati (1930, 1932, 1934) observe la granulopoïèse intense qui a lieu dans le mésenchyme du pancréas chez l'embryon de Poulet et affirme la persistance des deux types d'îlots chez l'adulte.

3° Enfin, la troisième période suit l'identification des deux types d'îlots chez l'Oiseau adulte par Nagelschmidt (1939). On cherche alors à préciser la date d'apparition des différentes cellules endocrines chez l'embryon. Villamil (1942) décrit la formation indépendante des deux types d'îlots au huitième jour de l'incubation ; par la technique à l'azan de Heidenhain, il observe les premières cellules A granulées dans les îlots sombres de la branche splénique à 8 jours ; les premières granulations β colorées en orange grisâtre par l'azan apparaissent autour de 12 jours. Entre temps, différentes colorations spécifiques sont mises au point pour la démonstration des cellules pancréatiques endocrines : modification de l'azan par une oxydation permanganique préalable qui augmente l'affinité de l'azocarmin pour les granulations α (Gomori, 1939), hématoxyline chromique-phloxine (Gomori, 1941), fuchsine paraldéhyde (Gomori, 1941, modifiée par Gabe, 1953). Ghiani (1956) trouve les premières cellules à grains ploxinophiles et argyrophiles (grains α) dans l'ébauche dorsale de l'embryon de 96 jours et les premières granulations colorables à la fuchsine-paraldéhyde (β) chez l'embryon de 13 à 14 jours. Nous avons fait une étude analogue (Lièvre, 1957 *a* et *b*) et avons d'abord trouvé les premières granulations α et β à 15 et 17 jours ; par la suite, nous avons pu mettre en évidence les deux types de grains chez des embryons plus jeunes (9-10 jours), mais d'une manière inconstante. Grillo (1961) signale également que les granulations β se colorent difficilement avant 16 jours. Thommes (1960) décrit par contre des cellules colorables par la

fuchsine-paraldéhyde et la méthode au DDD chez l'embryon de 7 à 8 jours ; il s'agit pour cet auteur de cellules B.

Pour Drukker (1961) enfin, le cytoplasme des cellules B a une affinité pour la fuchsine-paraldéhyde à partir de 7 jours. Quant aux cellules A, d'après cet auteur, elles se différencieraient à partir de cellules migratrices ou « cellules α primitives » ; ces cellules proviendraient d'un tractus situé dans le mésentère et reliant l'ébauche de la surrénale et le plexus sympathique préaortique au pancréas dorsal. Elles viendraient coloniser le pancréas et leur origine probable serait la crête neurale.

Les différents auteurs qui ont essayé de mettre en évidence les granulations spécifiques α et β chez l'embryon aboutissent donc à des observations très divergentes. Cette incohérence tient à la cytologie particulière du matériel embryonnaire ; les colorations adaptées aux cellules adultes donnent des résultats médiocres et inconstants sur les cellules peu différenciées des organes embryonnaires. Cette constatation a été faite par différents chercheurs et par nous-même. Elle peut s'expliquer par plusieurs facteurs ; les granulations spécifiques, ainsi d'ailleurs que les organites cytoplasmiques sont nécessairement peu abondants et de petite taille au moment où ils apparaissent ; en outre, il y a sans doute compétition entre l'excrétion de l'hormone élaborée et son stockage sous forme de grains figurés ; ces deux facteurs peuvent expliquer la présence ou l'absence de grains chez des individus du même stade, la coloration se situant dans tous les cas aux environs du seuil de visibilité au microscope photonique. Signalons enfin, en ce qui concerne les grains α, que les techniques de coloration font intervenir une différenciation qui introduit une nouvelle cause de variabilité. Il est donc illusoire de se référer à la présence des granulations pour déterminer le début de l'activité endocrine. Néanmoins, la connaissance précise de l'histogenèse des différentes ébauches est nécessaire à l'étude ultrastructurale et expérimentale que nous avons entreprise. Aussi fait-elle l'objet de la première partie de ce travail. Nous nous sommes attachée en particulier à préciser les étapes de la différenciation des ébauches jeunes et à localiser dans la mesure du possible les catégories cellulaires dans les différentes parties du pancréas.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Des œufs de Poule Leghorn blanche incubés à 38°5 sont utilisés. Les embryons présentent toujours des variations individuelles de développement assez importantes ; aussi les stades précoces sont-ils identifiés à l'aide de la chronologie de Hamburger et Hamilton (1951).

Les ébauches pancréatiques sont fixées au liquide de Halmi. Aux stades jeunes (2 à 3 jours), suivant les cas les embryons sont fixés en entier, ou bien l'ébauche pancréatique est disséquée. Aux stades ultérieurs les pancréas sont fixés avec l'anse duodénale et la rate, ou fixés isolément ; dans ce cas il faut prendre garde de conserver le lobe splénique en entier. Toutes les pièces histologiques sont coupées à 5 μ et montées en séries alternées, de manière à permettre l'application de colorations différentes à des coupes voisines.

La mise en évidence des granulations endocrines α a été faite à l'aide de l'azan de Heidenhain précédé d'une oxydation permanganique selon Gomori (1939, 1941). Nous avons observé que les granulations des cellules embryonnaires se colorent plus fortement après une oxydation permanganique forte. En conséquence, les coupes sont traitées pendant 5 minutes par le mélange suivant :

MnO_4K, 2,5 0/0	1 partie
SO_4H_2, 5 0/0	1 partie

Les granulations β sont colorées par la fuchsine-paraldéhyde (*f-pa*) selon Gabe (1953). Certaines coupes sont colorées par la technique de Hotchkiss-McManus (1948) à l'acide périodique-réactif de Schiff (APS) suivi d'une coloration de fond par l'hémalun-picroindigocarmin.

Pour l'étude des grains de zymogène, les pièces sont fixées au liquide de Maximov et les coupes colorées par la triple coloration de Gabe et Martoja-Pierson (1957).

L'étude de la répartition du tissu insulaire par rapport au tissu exocrine a été faite sur des coupes colorées par la méthode de Pappenheim-Unna au vert de méthylepyronine, après fixation au liquide de Carnoy.

I. — Formation de l'ébauche pancréatique dorsale chez l'embryon de 3 jours.

1° A la fin du 3e jour d'incubation chez l'embryon de 30 à 36 somites (*stade 18 de* Hamburger et Hamilton) l'ombilic intestinal antérieur est largement ouvert. Au niveau de cet ombilic, l'endoderme dorsal de l'intestin présente un épaississement déjà important, composé de plusieurs assises de cellules ; cet épaississement s'étend sur une longueur d'environ 190 μ (fig. 1). Il est particulièrement développé le long de la veine

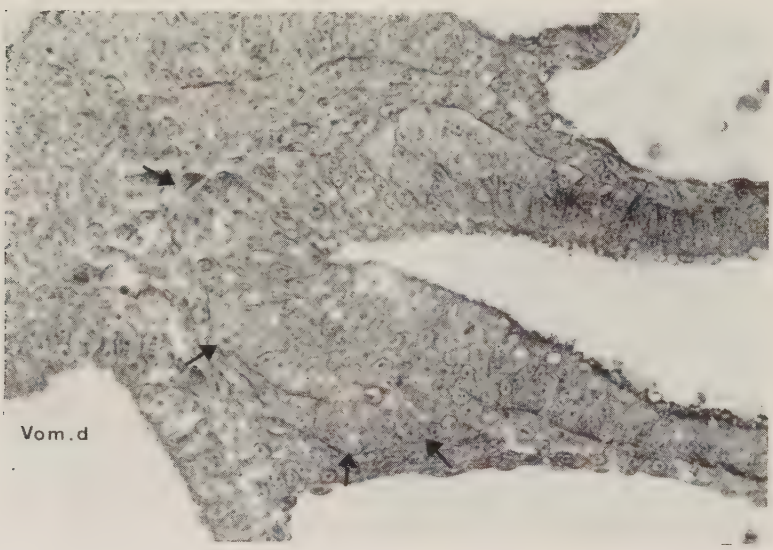


Fig. 1. — Embryon de Poulet au stade 18 de Hamburger et Hamilton. Coupe transversale au niveau de l'épaississement dorsal de l'endoderme intestinal (flèches). Vom. d. = veine omphalomésentérique droite (Bouin, APS. × 315.

omphalomésentérique droite ; des nids cellulaires bourgeonnants s'accolent à la paroi de la veine. Cet épaississement représente la première différenciation de l'ébauche pancréatique dorsale, ébauche qui se formera chez l'embryon de 3 à 4 jours.

2° *A partir du stade 19 de* Hamburger et Hamilton, il devient possible de distinguer macroscopiquement et d'isoler le bourgeon pancréatique dorsal. L'endoderme intestinal est visible sous forme d'une ligne blanche opaque qui court tout le long du tube digestif, rectiligne à l'intérieur du mésenchyme transparent. L'ébauche pancréatique dorsale est un épaississement de cette ligne opaque. A l'histologie, l'ébauche se révèle individualisée et déjà très développée. C'est une évagination dorsale de l'intestin, comprenant un diverticule court et large de la cavité intestinale

et un gros bourgeon plein étroitement moulé sur la veine omphalomésentérique droite.

3° *Entre les stades 19 et 21* la tige s'allonge, la cavité en devient étroite ; au stade 21 le prélèvement du bourgeon ne présente plus aucune difficulté, car on observe facilement à la loupe binoculaire le bourgeon et

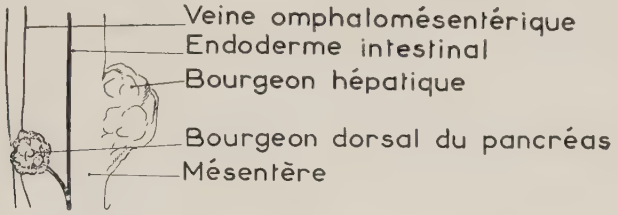


Fig. 2. — Schéma du bourgeon dorsal du pancréas au stade 21 de Hamburger et Hamilton. Vue latérale droite.

sa tige, tous deux d'un blanc opaque, insérés sur l'endoderme de l'intestin, en position dorsale ; le bourgeon est dressé en direction céphalique, incliné vers la droite de l'embryon et accolé à la paroi de la veine omphalomésentérique droite dont il dévie légèrement le trajet (fig. 2). L'histologie montre que le bourgeon est constitué de cellules épithéliales serrées. Il a déjà proliféré de manière considérable et s'étend dans le mésenchyme du mésen-

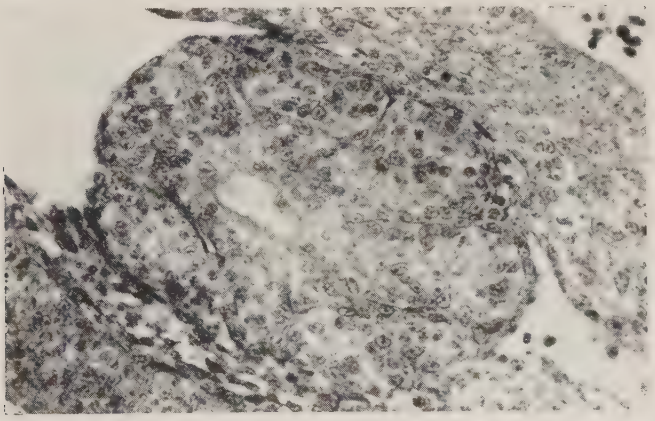


Fig. 3. — Stade 19 de Hamburger et Hamilton. Coupe longitudinale passant par le fond du bourgeon dorsal du pancréas. Remarquer les capillaires périphériques qui s'insinuent entre les nids de cellules (Bouin, Azan. × 350).

tère. D'abondants capillaires entourent le bourgeon et s'insinuent entre des groupes de cellules externes donnant au bourgeon un aspect lobulé (fig. 3). Ces groupes de cellules présentent des noyaux allongés disposés régulièrement à la périphérie des nids cellulaires, tandis que le cytoplasme abondant en occupe le centre. Après coloration par l'azan,

on distingue dans certaines cellules une fine poussière granuleuse rougeâtre, qui confère au cytoplasme un aspect polarisé. Après action de l'APS le cytoplasme prend une coloration rose diffuse irrégulière. De petites masses de matériel rose plus vif sont distribuées au hasard dans certaines cellules. Pendant les jours suivants de l'incubation cette coloration rose s'intensifie et se localise nettement dans les cellules insulaires.

La cavité centrale de l'ébauche contient un matériel colorable par l'APS, qui reste coloré après digestion amylasique. Il s'agit, sans doute, de mucopolysaccharides analogues à ceux de la cavité intestinale.

A la fin du 3e jour d'incubation, le pancréas est donc représenté par son ébauche dorsale : un bourgeon épithétial plein dans une gaine de mésenchyme. Les deux éléments, épithétial et mésenchymateux, ne sont pas intimement mêlés. Cette ébauche, qui ne possède pas d'affinités tinctoriales réellement spécifiques, présente cependant des caractères différentiels typiques de sa nature pancréatique, tels que la disposition des cellules et l'aspect des noyaux, différents de ceux de l'intestin ou du foie. En outre ces caractères évoquent une structure endocrine :

— disposition compacte des cellules qui ne ménagent pas d'autres lumières que la cavité centrale de l'organe ;
— capillarisation abondante.

Ces caractères sont bien différents de ceux des ébauches ventrales qui apparaissent les jours suivants, et se retrouvent intensifiés dans le lobe splénique de l'embryon un peu plus âgé.

II. — Différenciation des ébauches ventrales chez l'embryon de 4 jours.

Au cours du 4e jour d'incubation, le bourgeon dorsal poursuit sa croissance rapide, mais conserve son architecture générale, tandis que se différencient les deux bourgeons pancréatiques ventraux (fig. 5). Macroscopiquement le duodénum est encore rectiligne à ce stade ; le pancréas dorsal peut être distingué comme une série de petites taches opaques

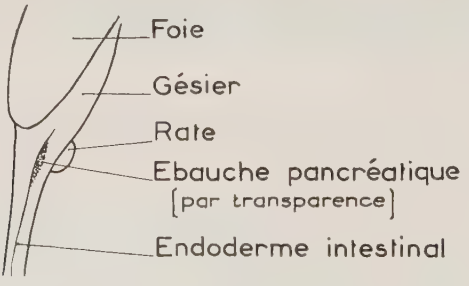


Fig. 4. — Schéma de la région pancréatique en vue ventrale chez un embryon de 4 jours.

visibles par transparence dans l'épaisseur du mésenchyme intestinal immédiatement sous le renflement du gésier (fig. 4). Les ébauches ventrales ne sont pas visibles ; la rate, qui a une forme allongée à ce stade, s'accole étroitement au gésier.

Les bourgeons pancréatiques dits *ventraux* s'insèrent en réalité en position latérale de chaque côté du conduit hépato-entérique. A ce stade, il s'agit d'un conduit biliaire commun ou canal cholédoque transitoire qui reçoit les diverticules hépatiques antérieur et postérieur et les deux conduits pancréatiques ventraux (fig. 5 et 6). (Par la suite ce canal disparaît en se divisant jusqu'au duodénum si bien que les deux canaux excréteurs pancréatiques ventraux, le canal cystico-entérique et le canal hépato-entérique s'ouvrent directement dans le duodénum). Le bourgeon ventral droit apparaît le premier, il est donc un peu plus développé que le bourgeon gauche. Tous deux sont des excroissances massives et irrégulières de l'épithélium intestinal, creusées d'un court diverticule de la lumière intestinale ; ces lumières contiennent du matériel colorable à l'APS, analogue à celui de l'intestin et à celui de la cavité du bourgeon dorsal. Les cellules du fond du bourgeon sont hautes avec un cytoplasme abondant et un gros noyau clair à motte de chromatine. Une membrane basale nette isole les cellules épithéliales du mésenchyme environnant qui constitue une gaine mince. Les bourgeons ventraux ne contiennent pas de formations cordonales isolées comme celles du bourgeon dorsal. Le bourgeon droit s'accole assez étroitement à la paroi de la veine omphalomésentérique droite comme le bourgeon dorsal. La coupe transversale de l'embryon de 4 jours et le schéma correspondant (fig. 5 et 6) sont ceux d'un embryon relativement évolué ; les mouvements tournants qui affectent le duodénum le jour suivant commencent à s'ébaucher, si bien que le bourgeon ventral droit se trouve rapproché du pancréas dorsal.

Le bourgeon dorsal, chez l'embryon de 4 jours, est devenu très important ; il présente une tige courte à large lumière. La paroi de cette tige est constituée d'un épithélium pseudostratifié identique à celui de l'intestin. La membrane basale de l'intestin persiste autour de la tige, mais devient très fine, disparaissant complètement par endroits. Le bourgeon lui-même est étroitement accolé à la paroi de la veine omphalomésentérique droite ; il conserve une structure épithéliale compacte : à l'extrémité apicale seulement, des cellules mésenchymateuses serrées pénètrent entre les groupes de cellules épithéliales. Ces groupes de cellules épithéliales, qui constituent la masse du bourgeon, affectent une disposition caractéristique ; ils forment des cordons entourés d'une membrane basale et parfois d'une capsule de fibroblastes ; ils ne présentent aucune lumière (fig. 7). De nombreux capillaires pénètrent entre ces formations. Noyaux et cellules ont une forme allongée et sont disposés en rangs assez réguliers. Par la suite ces formations deviennent de plus en plus nombreuses et constituent la totalité de la branche splénique du pancréas. Cette branche splénique a alors des caractères endocrines certains. Il est évident que les formations cellulaires isolées à 4 jours sont l'ébauche des îlots

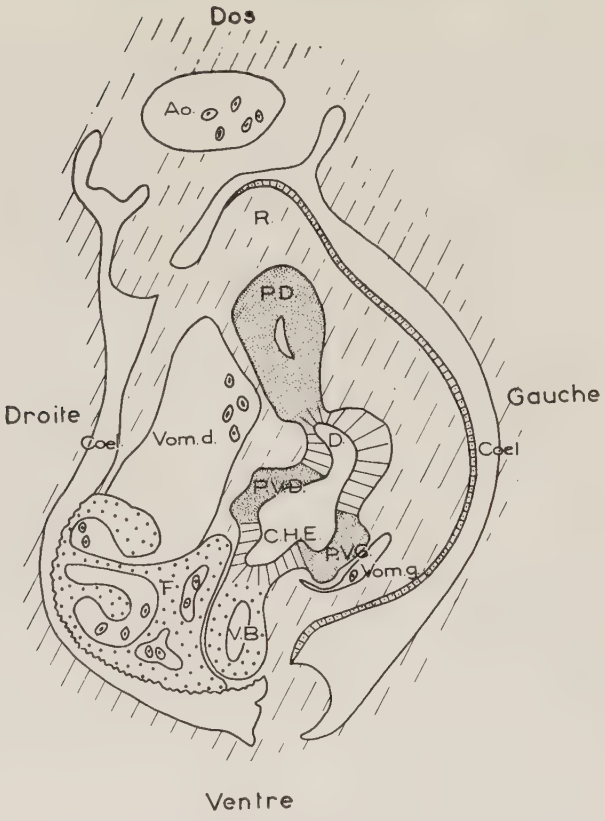


Fig. 5. — Schéma de la coupe transversale d'un embryon de 4 jours au niveau des bourgeons pancréatiques. Ao. = aorte dorsale. C. H. E. = canal hépatoentérique. Cœl. = cœlome. D. = duodénum. P. V. D. = pancréas ventral droit. P. V. G. = pancréas ventral gauche. R. = rate. V. B. = vésicule biliaire. Vom. d. = veine omphalomésentérique droite. Vom. g. = veine omphalomésentérique gauche.

endocrines. En outre elles présentent, surtout à la partie apicale du bourgeon, des caractères de colorabilité particuliers :

— une certaine affinité pour le réactif de Schiff après oxydation periodique ;

— une affinité cytoplasmique discrète pour l'azocarmin après oxydation permanganique forte. Cette coloration a un aspect finement granulaire, mais n'est pas assez nette pour permettre d'affirmer la présence de grains α.

Donc chez l'embryon de 4 jours révolus, les trois ébauches pancréatiques sont formées, complètement distinctes les unes des autres ; le bourgeon dorsal est beaucoup plus évolué que les bourgeons ventraux et son architecture histologique préfigure celle de la branche splénique du pancréas définitivement constitué.

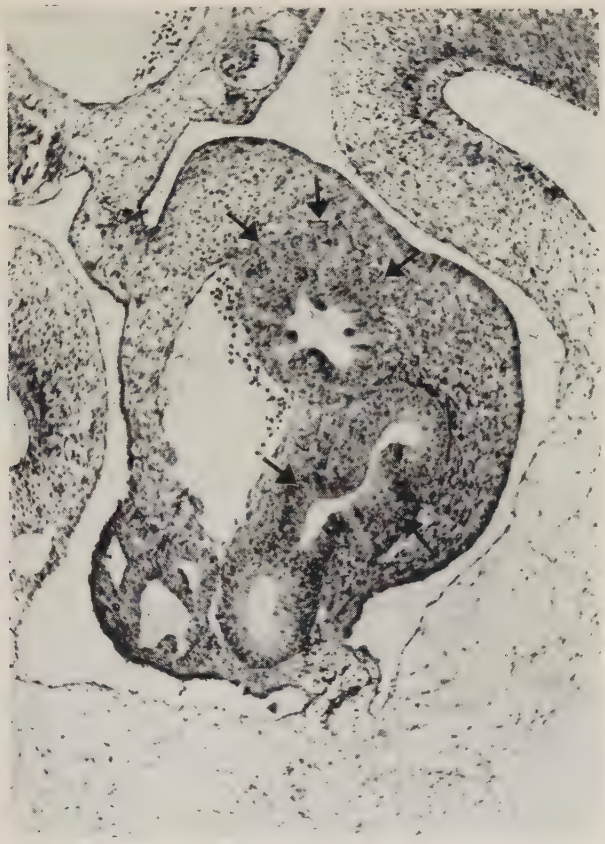


Fig. 6. — Coupe transversale d'un embryon de 4 jours au même niveau. Les flèches indiquent les différents bourgeons pancréatiques (Bouin, Azan. × 85).

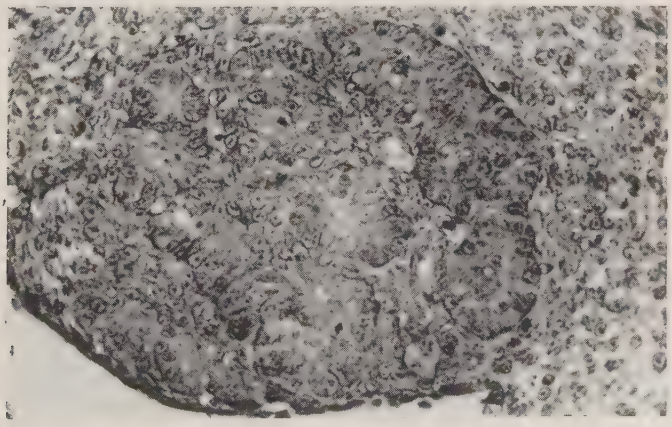


Fig. 7. — Détail du bourgeon dorsal du pancréas chez l'embryon de 4 jours. Cordons cellulaires compacts entourés d'une membrane basale qui se colore en rose par l'APS (Bouin, APS. × 350).

III. — Apparition des tubules primitifs chez l'embryon de 5 jours.

Pendant le 5e jour d'incubation commence à se former la courbure de l'anse duodénale (fig. 8). La portion de l'intestin comprise entre le gésier et l'ouverture des bourgeons pancréatiques s'est étendue considérable-

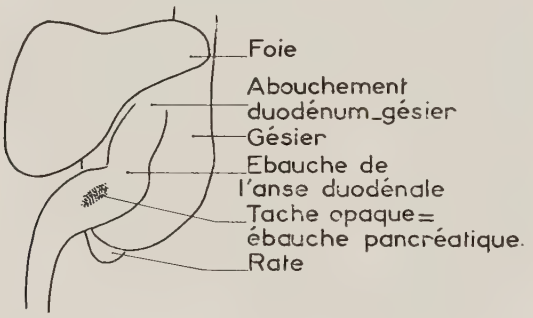


Fig. 8. — Schéma de la vue ventrale de la région du gésier chez un embryon de 5 jours.

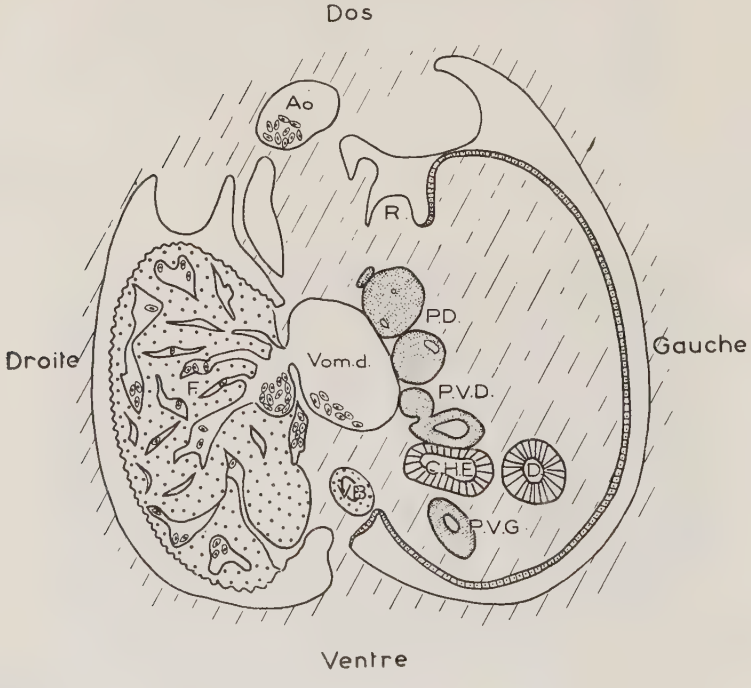


Fig. 9. — Schéma de la coupe transversale d'un embryon de 5 jours au niveau des ébauches pancréatiques. Mêmes abréviations que dans la figure 5.

ment, constituant l'ébauche du duodénum, plus ou moins sinueuse suivant le degré de développement de l'embryon. Le pancréas se présente comme une série de petits anneaux opaques visibles par transparence dans l'épaisseur du mésenchyme intestinal, immédiatement après cette sinuosité que décrit le duodénum. L'examen microscopique montre que l'organe s'est développé en direction céphalique et se dresse sur sa base duodénale. Les coupes transversales montrent que le bourgeon ventral droit s'est accolé au pancréas dorsal par suite du mouvement tournant effectué par le duodénum (fig. 9 et 10). Néanmoins les deux ébauches sont contigues, mais encore nettement distinctes. Le bourgeon ventral gauche reste isolé à ce stade.

Par rapport aux stades précédents on observe dans le bourgeon dorsal l'apparition d'une architecture typique du pancréas embryonnaire où voisinent les tubules primitifs et les îlots. Les tubules sont constitués par

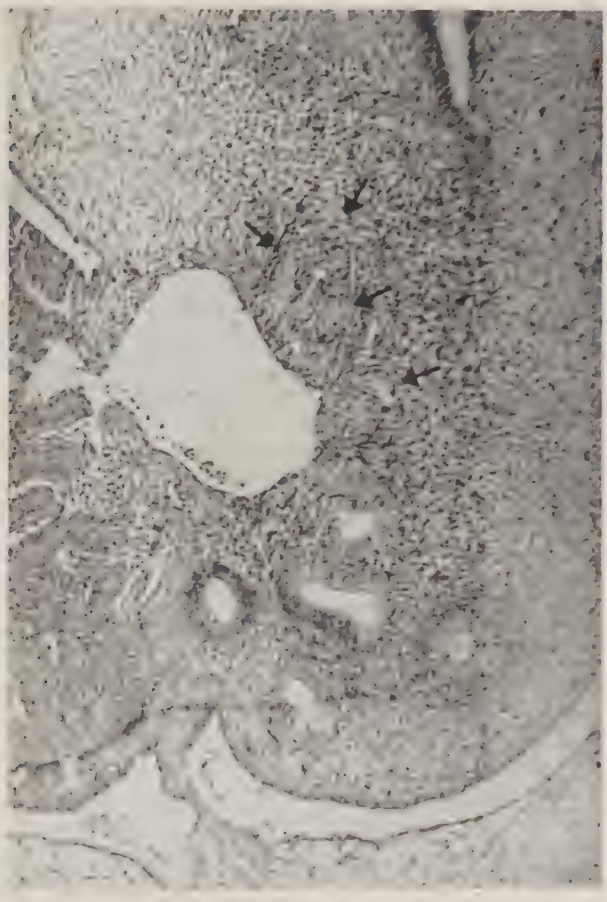


Fig. 10. — Coupe transversale de l'embryon de 5 jours. Les flèches indiquent les ébauches dorsale et ventrale droite accolées (Bouin, PAS. × 76).

une assise de cellules épithéliales cylindriques qui délimitent une lumière ronde, régulière. Une fine membrane basale entoure les tubes. Les noyaux présentent un gros nucléole caractéristique. Les îlots, de taille très variable, sont ronds ou plus souvent allongés, sans lumière, entourés d'une ceinture de capillaires. Ils présentent une très nette coloration rose après mise en œuvre du PAS. Les noyaux sont situés à la périphérie des îlots, la chromatine est divisée en grains fins.

Les tubules sont situés à la base du pancréas à proximité des points d'insertion sur le duodénum ; les îlots sont de plus en plus nombreux et de plus en plus grands vers le partie apicale du bourgeon dont la structure est identique à celle du bourgeon de 3 jours. La caractéristique générale du pancréas de 5 jours est son architecture compacte : à part la capillarisation riche et la capsule fibroblastique qui entoure les îlots, l'organe est de nature épithéliale, le mésenchyme ne pénètre pas entre les tubules et les îlots, mais constitue une capsule périphérique. La rate, de nature mésenchymateuse indifférenciée à ce stade, est en continuité directe avec cette capsule du pancréas.

IV. — Fusion des ébauches et première identification des îlots chez l'embryon de 6 jours.

Pendant le 6e jour d'incubation s'ébauchent les mouvements morphogénétiques complexes qui réalisent la courbure de l'anse duodénale et qui amènent le pancréas, de sa position initiale dorsale, à la droite du gésier. Au cours de ces mouvements, la portion de l'intestin située entre le gésier et l'abouchement des canaux hépatiques et pancréatiques, portion à l'origine très courte, acquiert une longueur considérable et se recourbe ; les canaux hépatiques et pancréatiques sont entraînés dans ces mouvements et, à leur terme, s'abouchent presque en haut de la branche montante de l'anse duodénale. En même temps, la région tout entière, c'est-à-dire non seulement l'intestin, mais la rate, le pancréas, la vésicule biliaire, effectuent un mouvement tournant et se retrouvent sur le côté droit de l'embryon. Ce sont ces mouvements qui débutent pendant le 6e jour. A la fin du 6e jour, les 3 canaux excréteurs du pancréas s'insèrent sur l'intestin à la base de la branche montante du duodénum, presque au fond de l'anse ; toute la masse glandulaire se développe au-dessus des canaux en direction céphalique et il n'est plus possible de distinguer nettement la contribution des trois ébauches primitives. Les canaux se ramifient en tubules à lumière large et régulière ; la paroi des tubules est formée de cellules à grand noyau et nucléole unique très marqué ; du mésenchyme serré assez abondant s'insinue entre les tubes ; il n'y a pas d'îlots endocrines dans cette région située à proximité des canaux excréteurs. Le caractère de la glande change à mesure que l'on s'approche de la région splénique : des îlots, dont la nature endocrine est certaine, font leur apparition (fig. 11) ; ce sont des groupes cellulaires compacts sans

lumière centrale, entourés d'une capsule fibroblastique et de capillaires ; les noyaux à petites mottes de chromatine sont absolument distincts des noyaux tubulaires, le cytoplasme abondant et clair prend une teinte rose vif à l'APS qui tranche sur l'absence de coloration des cellules tubulaires ou mésenchymateuses. Les îlots deviennent de plus en plus grands et de plus en plus abondants dans la région juxtasplénique. Par contre le mésenchyme est très peu abondant. Les lumières des tubules ont un aspect déchiqueté, elles sont sinueuses, irrégulières, petites, parfois au contraire béantes. On observe souvent des débris ou des ponts cytoplasmiques à l'intérieur, ou bien un noyau se trouve directement en contact avec les

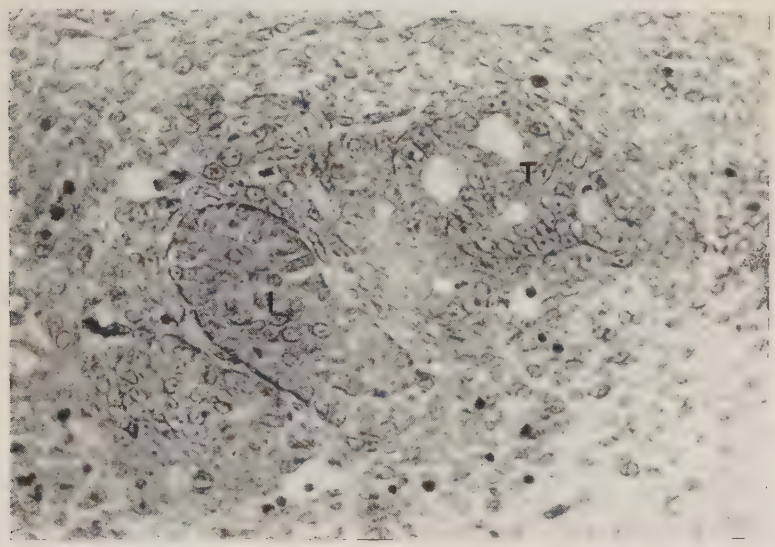


Fig. 11. — Pancréas de l'embryon de 6 jours. Tubules (T.) contigus à un îlot. Le tour de l'îlot (I.) est particulièrement coloré par l'APS (Halmi, APS. × 315).

cavités et il apparaît clairement que dans cette région les tubules se creusent par dégénérescence cellulaire.

Fait important, à partir de ce stade, la coloration à l'azan différencie les deux types d'îlots : les îlots A se colorent en rouge assez clair, comme aux stades précédents, les îlots B se colorent en bleu gris. Ces caractères distinctifs évidents amènent à constater que le seul aspect des noyaux, ainsi que la disposition des cellules permettent de reconnaître les îlots. Les îlots B sont peu nombreux, mais de grande taille. Ils sont de forme globuleuse, les cellules y sont disposées sans ordre, les noyaux présentent une chromatine finement divisée. Après coloration par la fuchsine-paraldéhyde ces îlots prennent une teinte mauve qui ne semble pas correspondre à la présence de grains β ni par sa répartition ni par son intensité : c'est une coloration très faible et diffuse dans le cytoplasme, analogue, mais moins intense, à celle que confère le réactif de Schiff après oxydation

periodique, à ces mêmes cellules ; il est possible que cette affinité pour la *f- pa* soit due à la présence de grains immatures ou de grains de taille très petite. Il existe généralement à l'extrémité juxtasplénique du pancréas un très gros îlot B, formé de quelques centaines de cellules, dont la différenciation précède celle des autres îlots B. Les îlots A ont une forme allongée, les cellules y sont disposées en deux cordons réguliers, les noyaux placés à la périphérie de l'îlot, le cytoplasme très abondant vers le centre ; toutes les cellules, ou presque, sont donc en contact avec la ceinture capillaire de l'îlot. Les noyaux sont clairs, de grande taille, de forme ovale, montrent 2 ou 3 petites mottes de chromatine et sont rangés très régulièrement. Après coloration par l'azan, on voit dans le cytoplasme de fines et encore peu nombreuses granulations rouge orangé, réfringentes, qui apparaissent polarisées, c'est-à-dire plus abondantes au pôle capillaire des cellules et plus clairsemées vers le centre de l'îlot. Les îlots sont généralement isolés et entourés d'une capsule de fibroblastes ; il arrive cependant qu'on trouve un îlot en continuité avec un tubule et qui apparaît « bourgeonné » par ce tubule.

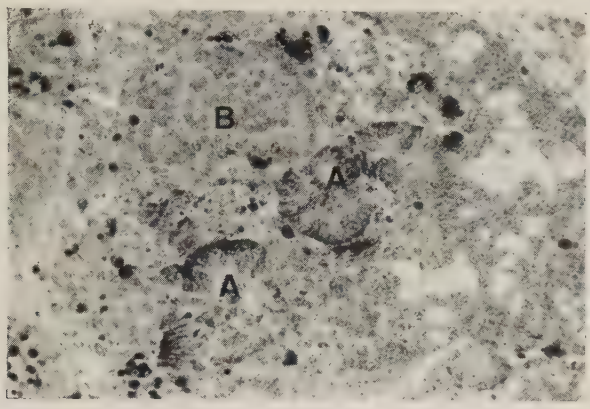
Deux processus importants dans l'organogenèse du pancréas se déroulent donc au cours du 6e jour d'incubation :

— des mouvements cellulaires qui confèrent à l'ébauche son organisation indivise ;

— au niveau cellulaire la réalisation d'un degré de différenciation qui permet de distinguer les deux types d'îlots.

V. — Différenciation massive des granulations α chez l'embryon de 7 jours.

Chez l'embryon de 7 jours, la différenciation cytologique des îlots A, telle que la révèle le microscope optique, marque une étape fondamentale : les granulations α que l'on devinait aux stades précédents, deviennent très colorées et très abondantes ; les îlots A se détachent en rouge vif sur le reste du pancréas, il est même possible d'identifier par leur coloration à l'azan des cellules A isolées. Les granulations α sont particulièrement abondantes au pôle basal des cellules, en contact avec les capillaires (fig. 12). On observe, en outre, une multiplication des îlots A à ce stade : partout de petits groupes de cellules A s'accolent latéralement à des tubules ; on trouve également des cellules A uniques différenciées dans la profondeur de la paroi des tubules. Ces observations montrent que des cellules A continuent à se différencier à partir des cellules tubulaires. Le processus de formation de cavités tubulaires par dégénérescence de cellules s'accentue et certaines plages cellulaires disséminées dans la région splénique prennent un aspect d'écumoire. Ces phénomènes de dégénérescence intéressent exclusivement les cellules tubulaires, « marquées » par leur noyau à gros nucléole, et non les cellules insulaires.



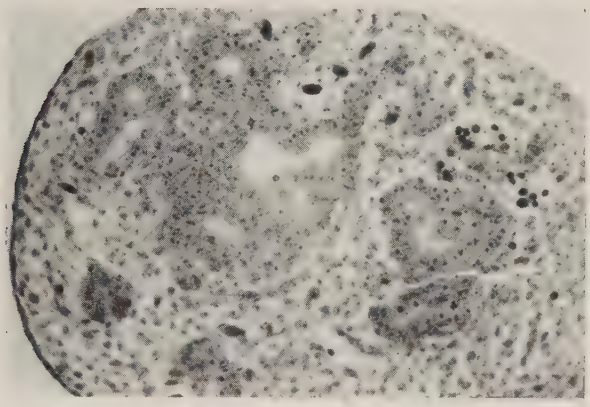


Fig. 12. — Lobe splénique du pancréas chez l'embryon de 7 jours. Ilots A à granulations très colorées. Un îlot B clair. Formation de lumières par dégénérescence cellulaire à droite (Halmi, Azan. × 235).

Fig. 13. — Branche ventrale du pancréas chez l'embryon de 8 jours. Tubules primitifs ramifiés dans du mésenchyme ; noter la différence de structure entre la branche splénique (fig. 12) et les branches ventrales (fig. 13) (Halmi, Azan, × 350).

VI. — Croissance des tubules primitifs, présence inconstante de granulations β, différenciation de pseudo-éosinophiles, à partir de 8 à 9 jours d'incubation.

Trois phénomènes nouveaux se manifestent à ce stade, et modifient sensiblement l'aspect histologique du pancréas :

1° L'anse duodénale s'allonge considérablement et dans sa courbure se développe une vaste étendue de mésenchyme lâche, solidaire de la paroi intestinale sur une grande longueur (fig. 14). Dans ce mésenchyme se ramifient des tubules pancréatiques, issus des canaux excréteurs abouchés à l'intestin (fig. 13). Ces tubules se développent en direction caudale. En

conséquence, il se forme deux régions complètement différentes dans le pancréas. La région voisine de la vésicule biliaire et de la rate forme une branche qui s'étend en direction céphalique au-dessus de l'anse duodénale et des canaux excréteurs du pancréas (fig. 15) et se termine au voisinage de la rate : c'est la branche splénique ou « queue » du pancréas, constituée presque exclusivement d'îlots endocrines, particularité que nous avons mise à profit dans notre travail expérimental ; cette branche splénique a donc la même architecture que l'ébauche jeune. La deuxième

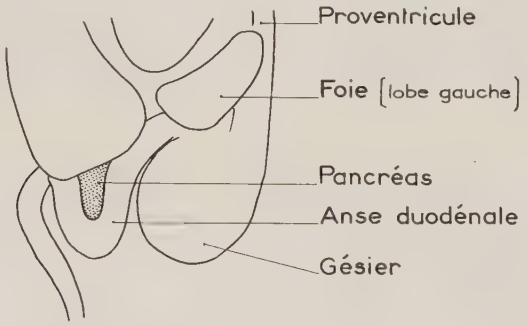


Fig. 14. — Vue ventrale schématique de la région du gésier et du duodénum chez l'embryon de 8 jours.

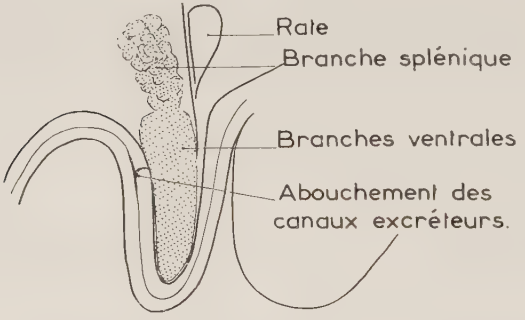


Fig. 15. — Vue schématique du pancréas chez l'embryon de 8 jours, lorsque le foie a été enlevé.

région ou « tête » du pancréas s'étend entre les branches de l'anse duodénale. Elle est constituée de tubules épithéliaux qui se ramifient régulièrement dans du mésenchyme lâche ; on ne distingue pas de formations, ni même de cellules, insulaires. L'histologie de cette région est donc complètement différente de celle de la queue du pancréas.

2° Dans certains pancréas de 8 à 9 jours, on observe des granulations β qui ne sont pas douteuses : elle sont toujours situées dans le ou les gros îlots de l'extrémité de la branche splénique : la fuchsine-paraldéhyde fait alors apparaître dans ces îlots une ceinture périphérique violette ; la colo-

ration est beaucoup plus intense que la teinte mauve prise par les îlots aux stades plus précoces, elle est nettement granulaire et polarisée en direction des capillaires. Il faut noter que la coloration n'est pas positive dans tous les pancréas de 8 à 9 jours.

3° Le troisième caractère nouveau qui s'introduit dans l'évolution du pancréas à ce stade est la différenciation, à partir des éléments mésenchymateux de l'ébauche, d'un nombre très important de granulocytes sanguins, du type éosinophile ou pseudo-éosinophile (fig. 16). Les premiers apparaissent vers 7 jours et à 9 jours ils sont déjà en nombre considérable. Ces cellules sont tout à fait spécifiques, mais, par suite des affinités tinctoriales variées de leurs granulations, elles ont souvent été confondues

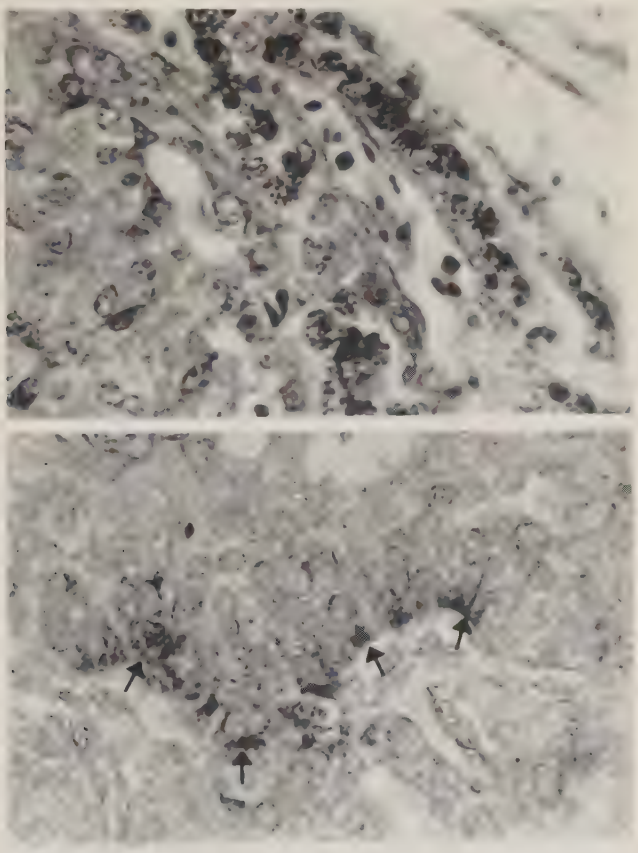


Fig. 16. — Pseudo-éosinophiles autour d'un capillaire de la branche splénique chez l'embryon de 17 jours. La disposition de ces cellules et la taille de leurs granulations permettent de les distinguer des cellules insulaires (Halmi, fuchsine-paraldéhyde. × 1.190).

Fig. 17. — Un îlot B dans la branche splénique du pancréas chez l'embryon de 17 jours. Les granulations (flèches) sont localisées à la périphérie de l'îlot (Halmi, fuchsine-paraldéhyde. × 1.190).

avec différents types de cellules insulaires. Leur distribution est absolument typique : ce sont des cellules libres, situées parmi les cellules du mésenchyme. Ces granulocytes sont à proximité des capillaires ou des vaisseaux plus importants, *autour* desquels ils constituent des amas (au contraire les îlots sont entourés par les capillaires). Ils sont particulièrement nombreux au pourtour de la branche splénique et le long de l'artère pancréatique. Ils possèdent un noyau polylobé très sombre, et de grosses granulations, relativement peu nombreuses, très réfringentes, rondes dans les stades jeunes. Ces granulations prennent fortement la fuchsine-paraldéhyde et les colorants acides (azocarmin) ; elles se colorent également par la méthode au DDD de Barnett, Marshall et Seligman pour les groupements — SH.

Donc, lorsque l'embryon de Poulet atteint la moitié de son développement, le pancréas contient déjà des cellules insulaires des deux catégories sous une forme différenciée. Cette constatation correspond aux observations faites sur d'autres organes endocrines qui se différencient dans des délais analogues (thyroïde, gonades).

VII. — Différenciation du tissu exocrine pendant la deuxième moitié de l'incubation.

1° *L'organe insulaire* ne présente pas de phénomènes d'évolution nouveaux ; il y a seulement une multiplication des îlots, soit aux dépens des îlots déjà existants, soit par la formation de nouveaux îlots ; la branche splénique prend une extension considérable, tout en restant presque purement endocrine jusqu'à l'éclosion ; elle est formée d'un massif compact de cellules A divisé en grands îlots ovales par des travées de capillaires. Quelques gros îlots B situés sur le pourtour du massif, voisinent avec les îlots A (fig. 17). Également à la périphérie de la branche splénique, se trouve une ceinture de tubules primitifs. D'autre part, de nouveaux îlots se forment dans tout le pancréas : îlots A dans le haut des branches ventrales à partir des canaux excréteurs, petits îlots B dans toute la glande aux dépens des cellules tubulaires. L'affinité tinctoriale des îlots B pour la fuchsine-paraldéhyde reste médiocre pendant toute la vie embryonnaire ; elle est d'abord limitée aux îlots de la branche splénique et ne se généralise dans les branches ventrales que vers 17 jours d'incubation. Jusqu'à 17 jours d'ailleurs, certains pancréas ne contiennent pas d'îlots B colorables. Ce n'est que plusieurs jours après l'éclosion que la coloration des îlots B par la fuchsine-paraldéhyde devient très vive, d'aspect nettement granulaire, et constante.

2° Si la branche splénique du pancréas possède son aspect histologique spécifique à 9 jours et ne fait que s'accroître par la suite, par contre, les branches ventrales, que nous appelerons partie exocrine du pancréas, évoluent considérablement pendant la deuxième moitié de l'incubation. On a vu plus haut la formation des tubules primitifs ; au début ces tubules

sont peu ramifiés et presque rectilignes ; ils sont constitués d'un épithélium simple, moyennement pyroninophile ; la lumière centrale est large, les noyaux présentent un gros nucléole, on ne trouve pas de cellules insulaires. Jusqu'à 12 jours le mésenchyme est très abondant entre les tubules : opposé à la structure épithéliale compacte de la branche splénique, l'aspect de cette région est caractéristique d'une ébauche dans laquelle les interactions entre mésenchyme et épithélium sont nécessaires à l'organogenèse.

A 13 jours, la région exocrine a toujours un aspect tubulaire, mais les tubules se sont beaucoup ramifiés et sont donc plus serrés. Cependant ils sont encore environnés de mésenchyme lâche ; de petits îlots composés de quelques cellules apparaissent appendus à l'épithélium, parfois en contact direct avec la cavité des tubules. Ces îlots ne présentent pas de granulations spécifiques, mais leur nature endocrine est décelée par leur très faible pyroninophilie, par rapport à celle des cellules tubulaires. Ils

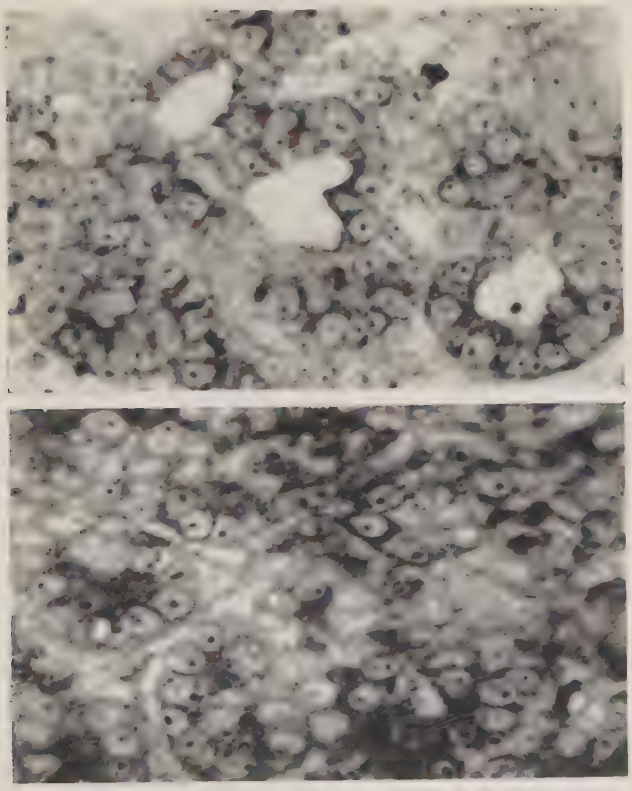


Fig. 18. — Tubules exocrines chez l'embryon de 15 jours.
Lumières larges ; présence de grains Z. rares (Maximov, trichrome de Gabe. × 850).

Fig. 19. — Acini exocrines chez l'embryon de 17 jours. Réduction des lumières, multiplication des grains Z. (Maximov, trichrome de Gabe × 850).

sont encore très rares dans les régions les plus éloignées de la branche splénique.

Entre 13 et 15 jours commence la différenciation du tissu exocrine. Les acini diffèrent des tubules primitifs par différents caractères :

1° leur lumière centrale très petite ou presque oblitérée. L'aspect général de la glande se trouve complètement modifié par la raréfaction des lumières ; ce processus est terminé à 17 jours (fig. 18 et 19) ;

2° le cytoplasme apical abondant ; quelques grains de zymogène y apparaissent à partir de 14 jours ; ceux-ci deviennent très nombreux et se rassemblent au pôle apical des cellules à 16-17 jours ;

3° l'ergastoplasme des cellules acineuses relativement peu développé chez l'embryon ne devient important qu'après l'éclosion ; aussi la basophilie des cellules acineuses n'est guère plus prononcée que celle des cellules tubulaires primitives.

VIII. — Le pancréas à la fin de l'incubation.

Il se présente comme un organe très allongé, compact, formé de trois lobes plus ou moins étroitement soudés entre eux (fig. 20) :

1° Le lobe splénique, fin et long, qui s'étend en direction orale au-dessus de l'anse duodénale, le long de la vésicule biliaire, et se termine au voisinage de la rate par une boule plus ou moins prononcée. Le lobe splénique qui provient du bourgeon dorsal originel est largement soudé aux deux lobes ventraux ; il est impossible de distinguer les limites des contributions des différents bourgeons à la masse glandulaire définitive ; en fait, il est probable que le lobe splénique ne comporte pas exclusivement la branche mince car le canal dorsal pénètre dans la glande au-dessous de cette branche mince. Le canal dorsal s'ouvre dans le duodénum au même niveau que les canaux hépatocystique et hépato-entérique, dans une position dorsale par rapport à ces canaux. Le lobe splénique est de nature endocrine prédominante et il est constitué en majeure partie d'îlots A. Pendant la deuxième partie de l'incubation et après l'éclosion, le tissu acineux s'accroît beaucoup plus vite que le tissu insulaire et son développement scinde le massif endocrine unique de l'embryon en îlots individualisés de grande taille. C'est ce lobe que nous désignerons souvent sous le nom de queue du pancréas.

2° Les deux lobes ventraux ou « tête » du pancréas sont liés par des anastomoses complexes, d'anatomie très variable et constituent une seule masse glandulaire divisée par un sillon longitudinal où se logent la veine et l'artère pancréatiques. Ils sont étroitement enserrés dans l'anse duodénale et se développent sur une longueur considérable. Les îlots y sont relativement abondants à l'extrémité antérieure au voisinage des canaux excréteurs ; vers l'extrémité postérieure les îlots plus rares et plus petits sont exclusivement de type B. Les canaux excréteurs ventraux sont

en général accolés l'un à l'autre. Souvent l'un des deux a un diamètre très petit. Ils s'abouchent sur une papille duodénale qui reçoit également les canaux hépatiques. Ils sont formés d'un épithélium plat dépourvu de basophilie doublé d'une paroi conjonctive épaisse ; ils pénètrent profondément à l'intérieur de la glande.

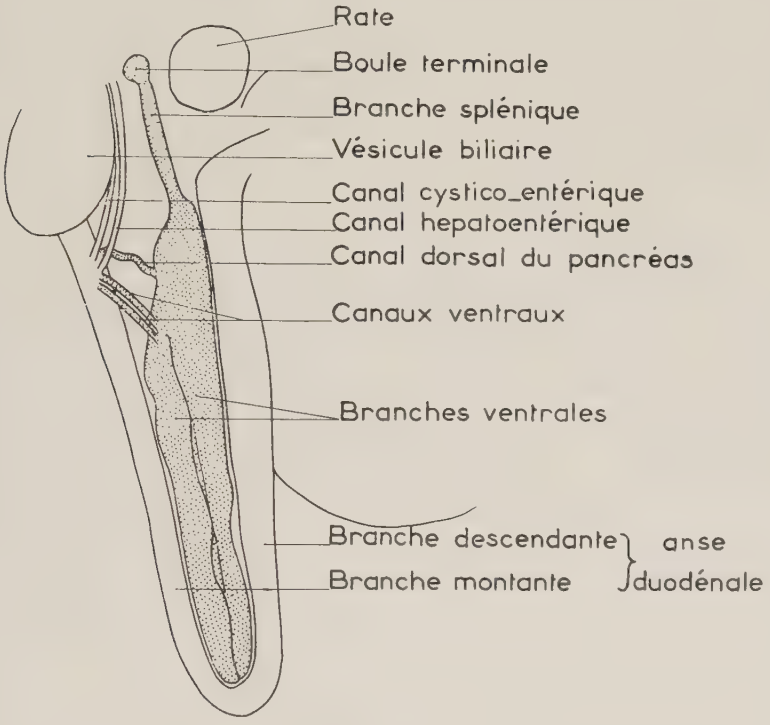


Fig. 20. — Schéma de l'anatomie du pancréas chez l'embryon de 12 jours ou plus (aspect moyen).

DISCUSSION

1° Nos publications antérieures (Lièvre, 1957 *a* et *b*) se rapportaient uniquement aux ébauches pancréatiques après 6 jours d'incubation. Nous avons étudié ici la genèse précoce des îlots à partir de la différenciation des bourgeons endodermiques dérivés de l'intestin. Grâce à l'emploi de diverses techniques, telles que l'APS, la possibilité de distinguer les deux types d'îlots à une date précoce est démontrée. De plus, la mise en évidence des granulations spécifiques a pu être réalisée également à un stade relativement jeune. En particulier, les granulations α embryonnaires présentent une plus vive affinité pour l'azocarmin après une oxydation permanganique très forte. On peut alors démontrer sans équivoque possible

leur présence chez l'embryon de 7 jours. Toutefois on observe aux stades plus jeunes des aspects qui laissent deviner la présence de granulations α : il s'agit d'une coloration rougeâtre finement poussiéreuse limitée à certaines formations insulaires et polarisée en direction des capillaires ; ces images existent déjà dans l'ébauche dorsale de 3 jours, mais ne constituent pas à elles seules, un critère suffisant de la fonction sécrétoire. Ces résultats sont en accord avec ceux de Ghiani (1956) qui trouve des granulations phloxinophiles dans l'ébauche dorsale à la 96e heure d'incubation.

2° Quel que soit l'âge où la différenciation cytologique est réalisée, il ne fait aucun doute que les deux types d'îlots coexistent dès le début de l'organogenèse, et persistent pendant toute la vie de l'animal. Les « îlots de Langerhans » ou îlots définitifs décrits par Potvin et Aron, dans le cadre de la théorie de Laguesse, correspondent exactement par leur description aux îlots sombres de Clara, c'est-à-dire aux îlots A ; les « îlots de Laguesse », transitoires d'après la théorie ancienne, sont en réalité les îlots clairs ou îlots à cellules B. La persistance des deux types d'îlots avait été soutenue par Benazzi-Lentati dès 1932, mais à l'époque, la signification des types cellulaires n'était pas connue et cet auteur établissait une filiation entre les deux catégories d'îlots. Quant aux phénomènes de dégénérescence cellulaire décrits par Potvin et Aron ou par Villamil, ils existent indubitablement (on verra dans la troisième partie de ce travail qu'ils prennent une grande importance dans les cultures organotypiques du pancréas embryonnaire). Mais plutôt que les cellules insulaires, nous pensons que ces processus de lyse cytoplasmique, puis nucléaire, frappent des cellules tubulaires primitives, marquées par leur noyau à gros nucléole, même lorsque ces processus se passent en bordure d'un îlot ; ce phénomène semble aboutir à la formation de lumières tubulaires et non pas à la disparition d'îlots primitifs.

3° Malgré la fusion précoce des trois ébauches pancréatiques, on peut affirmer que l'ébauche dorsale, qui se différencie la première, et dont le développement progresse plus rapidement, devient par la suite la branche splénique du pancréas. Il convient donc de réviser la nomenclature des lobes du pancréas adulte ; on a coutume en effet de parler de branche splénique, et de branches ventrale et dorsale ; au point de vue anatomique chez l'adulte, ces denières appellations ne sont pas justifiées et ne correspondent pas non plus à l'origine embryologique de ces branches ; c'est en réalité le segment splénique qu'on pourrait également désigner sous le terme de lobe (ou branche) dorsal, tandis que les deux autres branches, en fait plus ou moins soudées, représentent les branches ventrales. Quant à la localisation des îlots, on ne peut rien affirmer sans confirmation expérimentale, mais il semble bien que les îlots A se trouvent plus ou moins exclusivement localisés dans le lobe dorsal ou splénique, comme le faisaient remarquer Gianelli (1902, 1913), Pensa (1917) puis Ghiani (1956).

4° La différenciation en grand nombre de granulocytes sanguins dans le parenchyme du pancréas embryonnaire (Bennazzi-Lentati, 1932) à

donné lieu à certaines confusions. Chez l'embryon jusqu'à 17-18 jours, les granulocytes du type éosinophile ou pseudoéosinophile (cette dernière catégorie, appelée également hétérophile, est spécifique du sang des Oiseaux et correspond aux neutrophiles des Mammifères) possèdent des granulations rondes. Celles-ci présentent des affinités tinctoriales non seulement pour les colorants acides, mais pour la fuchsine-paraldéhyde et pour les colorants des groupements — SH (méthode au DDD). Thommes (1960) montre des images de cellules à grosses granulations colorées soit par la fuchsine-paraldéhyde, soit par la méthode au DDD, chez l'embryon de 7 jours ; il s'agit non de cellules B, mais de granulocytes en voie de différenciation. En effet, les granulations sont très grosses et réfringentes, alors que les grains β forment une fine poussière. Les cellules décrites par cet auteur sont indépendantes les unes des autres, localisées dans le stroma conjonctif, souvent dans la paroi même d'une artériole, alors que les îlots sont formés de cellules associées en un tissu épithélial cohérent. Nous pensons que ce sont ces mêmes cellules qui sont décrites par Drukker (1961) comme des cellules « α primitives », colorées cette fois par des colorants acides ; l'auteur les décrit en effet comme des cellules libres dans le stroma de la glande, et d'après leur distribution en traînées dans l'organe, conclut qu'elles viennent coloniser le pancréas, en provenance de la crête neurale.

En conclusion, l'étude de l'organogenèse du pancréas chez l'embryon de Poulet montre deux grandes phases dans son évolution :

1° la ségrégation précoce du tissu insulaire ;

2° la croissance des tubules épithéliaux qui sont à l'origine du tissu exocrine, dans les ébauches formées depuis plusieurs jours.

DEUXIÈME PARTIE

LA DIFFÉRENCIATION ULTRASTRUCTURALE DES TYPES CELLULAIRES DU PANCRÉAS EMBRYONNAIRE

INTRODUCTION

L'étude optique permet de bien comprendre l'architecture générale du pancréas embryonnaire, mais donne des résultats médiocres et inconstants dans la mise en évidence par des colorations spécifiques, des différents types cellulaires chez l'embryon ; la raison en est la petite taille et le nombre réduit des organites cytoplamiques, spécialisés ou non, au moment où ils commencent à se former. L'étude ultrastructurale de la cellule embryonnaire permettra de préciser la localisation, le stade d'apparition, la nature et l'évolution de ces organites dont la présence et l'aspect déterminent ou traduisent l'état fonctionnel de la cellule. On pourra apprécier ainsi des phénomènes imperceptibles par d'autres méthodes, phénomènes en corrélation avec la différenciation physiologique d'un organe.

Des études de cet ordre ont été faites par Münger (1958), par Pipan (1960) et par Koizumi (1963), sur le pancréas endocrine et exocrine de l'embryon de Souris ; par Ferreira (1957) et Zagury (1961) sur les tissus exocrine et endocrine de l'embryon de Rat ; par Zeigel (1962) sur le pancréas exocrine de l'embryon de Poulet. Nous avons nous-même publié un article préliminaire sur la différenciation des cellules endocrines A chez l'embryon de Poulet (Dieterlen-Lièvre, 1963). Les différents auteurs s'accordent pour trouver aux cellules embryonnaires les caractères ultrastructuraux suivants :

— abondance des grains de Palade libres ; faible développement des structures membranaires ; possibilité de déceler les grains de sécrétion à des stades plus précoces que par la microscopie optique.

Le pancréas de l'embryon prêt à éclore sera étudié d'abord ; on y trouve en effet les différents types de cellules à l'état de différenciation plus ou moins définitive ; la description des types cellulaires différenciés s'appuie également sur les images fournies par le pancréas d'un Poussin de 5 jours et d'un Coq adulte. Cette description permet de codifier les critères d'identification des types cellulaires. L'évolution de chaque lignée cellulaire au cours de l'organogenèse sera étudiée dans les chapitres suivants.

MÉTHODES

Les pièces sont fixées au liquide de Palade (1952) (OsO_4 à 1 0/0 et tampon véronal). Jusqu'à 4 jours, les ébauches pancréatiques sont fixées entières ; pour les stades ultérieurs de petits fragments sont prélevés dans les différentes parties du pancréas. Des fragments des branches ventrales sont prélevés pour l'étude du tissu exocrine ; des fragments du lobe splénique servent à l'étude du tissu endocrine ; la boule terminale du lobe splénique est toujours prélevée avec un soin particulier, car elle contient généralement un îlot B, au milieu des îlots A. Les premières pièces ont été incluses au méthacrylate ; par la suite, les techniques d'inclusion à l'araldite selon Glauert et Glauert (1958) et à l'epon selon Luft (1961) ont été adoptées. Les pièces incluses à l'araldite sont colorées à l'acétate d'uranyle en solution alcoolique avant l'inclusion. Après l'inclusion à l'epon, les coupes sont colorées sur grilles à l'acétate d'uranyle en solution aqueuse saturée (Watson, 1958). Les coupes ont été faites au microtome Porter-Blum et examinées à l'aide des microscopes OPL ou Hitachi.

CHAPITRE PREMIER

TYPES CELLULAIRES DU PANCRÉAS DIFFÉRENCIÉ

I. — La cellule acineuse et les cellules annexes du tissu exocrine (fig. 21 à 23)

Chez le Poulet, la disposition en acini est peu marquée ; on distingue cependant les différentes cellules typiques du pancréas exocrine : cellules exocrines, cellules centro-acineuses, et cellules des canaux excréteurs.

a) La cellule acineuse.

Elle est bordée d'une membrane péricellulaire contrastée, épaisse de 60 Å en moyenne ; un espace de 40 à 50 Å sépare les membranes de deux cellules voisines. La cellule acineuse est fortement polarisée ; elle présente un ergastoplasme basal très développé, tandis que le cytoplasme apical contient les grains de zymogène et dans la zone immédiatement supranucléaire, l'appareil de Golgi.

Le noyau est rond ou ovale, de forme régulière ; ses dimensions sont de 2 ou 3 μ. Il est entouré d'une double membrane dont chaque feuillet mesure 30 Å. Les deux feuillets sont séparés par un espace irrégulier : tantôt large de 50 Å, il peut s'élargir jusqu'à 600 Å, et semble alors faire partie du système des citernes cytoplasmiques ; le feuillet externe de la double membrane nucléaire ne se distingue lui-même en rien des membranes ergastoplasmiques : même contraste, même épaisseur, même revêtement de grains de Palade. En certains points on peut observer des communications entre le suc nucléaire et le cytoplasme ;

ces pores sont constitués par l'éversion du feuillet interne de la membrane nucléaire qui est en continuité directe avec le feuillet externe de chaque côté du pore ; le pore a un diamètre moyen de 50 mμ. Le suc nucléaire est finement grenu avec des zones de densité variable aux électrons. Chaque noyau a un gros nucléole très contrasté, souvent structuré. Ce nucléole est caractéristique du noyau de la cellule exocrine, par rapport à la cellule endocrine.

Le cytoplasme contient un *ergastoplasme* très développé. Souvent la composante membranaire en est faiblement contrastée, même après coloration des coupes par l'acétate d'uranyle. Ces membranes sont disposées

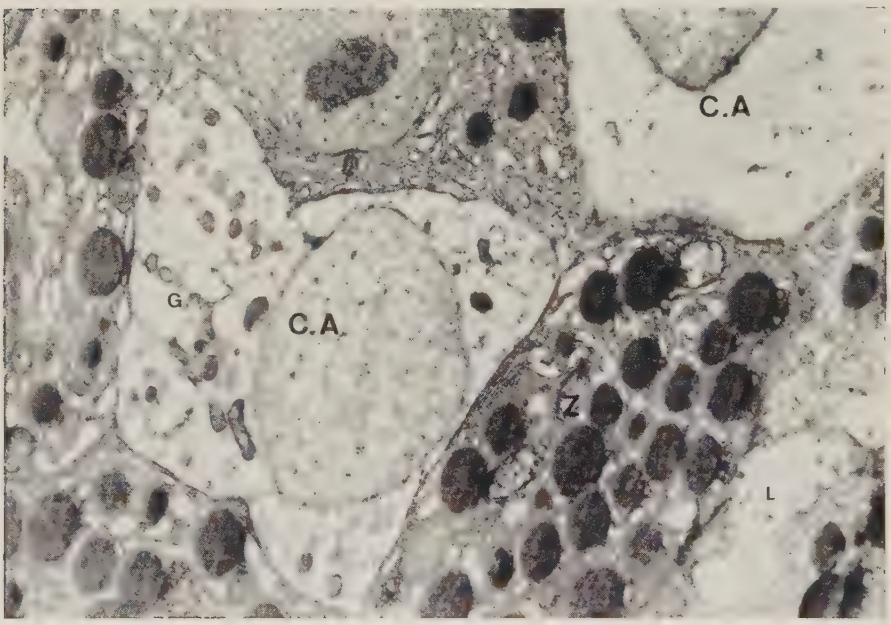


Fig. 21. — Le tissu exocrine chez le Coq adulte. Deux cellules centro-acineuses (C. A.) à appareil de Golgi vacuolaire (G.). Cellules acineuses à grains de zymogène (Z.), à ergastoplasme développé. Lumière (L.) centro-acineuse où se projettent des microvillosités. × 8.500.

tantôt en systèmes parallèles, tantôt en mailles irrégulières qui délimitent de larges citernes. Ces citernes ont un contenu clair dans lequel on distingue un fin réseau légèrement plus contrasté. Par opposition au contenu intracisternal, le cytoplasme délimité par les lamelles de l'ergastoplasme est moyennement opaque. La face cytoplasmique des membranes est couverte de grains de Palade de 80 Å de diamètre.

Les *grains de zymogène* (Z) sont rassemblés en grand nombre au pôle apical des cellules (fig. 21) ; ils sont situés dans le cytoplasme ; en aucun cas on ne trouve de grains « intracisternaux » comme ceux que Palade a décrits dans le pancréas du Cobaye. Les grains « Z » sont étroitement enser-

rés par les grains de Palade et les membranes du réticulum endoplasmique. Ils ont une forme ovale ramassée, ou ronde, leur diamètre atteint 1 μ sur 0,6 μ. Ils sont entourés d'une très fine membrane très peu contrastée, étroitement accolée à la substance du grain dont il est parfois difficile de la distinguer. La substance interne des grains présente une densité aux électrons assez forte. Il existe également des grains plus petits de tailles variées.

Chez l'embryon de 21 jours on trouve fréquemment des grains de *prozymogène*, très polymorphes. De forme ovale, ils mesurent en général 0,7

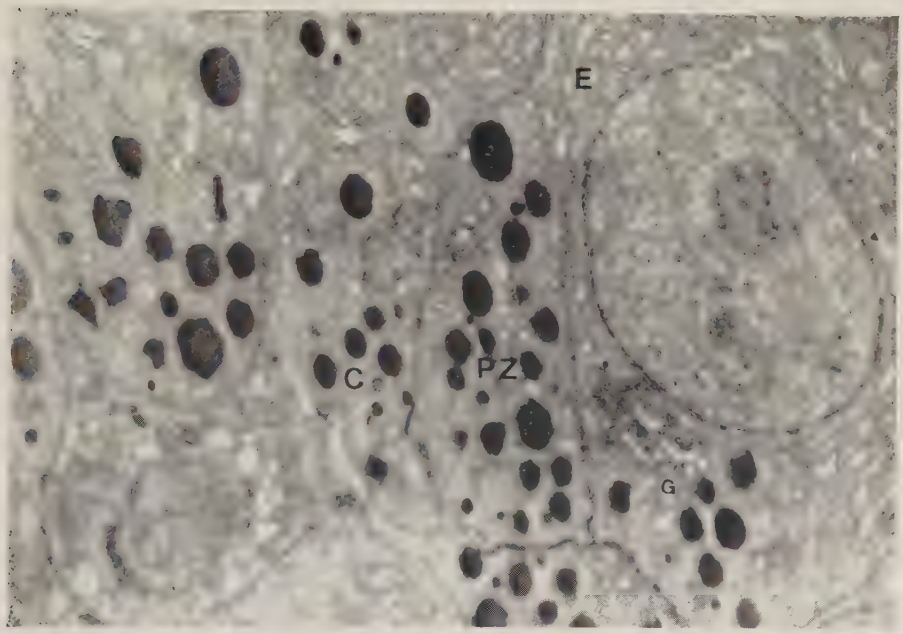


Fig. 22. — Cellules exocrines à grains de prozymogène (P. Z.) chez l'embryon de 21 jours. Ergastoplasme (E.) basal. Appareil de Golgi développé (G.). Centriole (C.) près de la lumière. × 7.000.

à 0,8 μ sur 0,3 μ, mais sont parfois plus gros que les grains Z. Ils sont entourés d'une membrane périphérique fine; cette membrane, au lieu d'enserrer très étroitement la substance interne du grain, en est séparée par une écorce claire de largeur variable ; la substance interne est fortement opaque aux électrons — comme celle des grains Z — elle a souvent une forme très irrégulière et un contour diffus et semble être noyée dans la substance claire qui constitue l'écorce. On observe toutes sortes d'intermédiaires entre des grains presque complètement remplis de substance opaque et des grains formés uniquement de substance claire (fig. 22 et 26).

Les grains de prozymogène sont toujours associés à une *appareil de Golgi* extrêmement développé ; il est constitué d'un système de 4 ou 5 sac-

cules parallèles dilatés, accompagnés de très grosses vacuoles claires ; les grains de prozymogène se mêlent à ces grosses vacuoles.

Enfin, de très abondantes petites vésicules s'associent aux grosses vacuoles. Autour de ce système de vacuoles et de vésicules le cytoplasme apical de ces cellules est riche en ribosomes libres.

Les mitochondries sont peu abondantes, trapues, de forme ovale, allongée, et de contour régulier ; leur largeur moyenne est de 0,5 μ, leur longueur moyenne de 1 μ. Elles présentent souvent une homologie de forme et de taille avec les grains Z ; elles sont délimitées par une double membrane dont chaque feuillet mesure 32 Å d'épaisseur. L'espace entre les feuillets est de 48 Å. Les crêtes sont transversales et serrées ; on voit souvent leur continuité avec le feuillet interne de la paroi de la mitochondrie. La substance interne est moyennement dense avec un fin réseau plus opaque. La matrice contient généralement deux ou trois corpuscules denses de 160 Å de diamètre. Dans les cellules qui contiennent des grains de prozymogène, la forme des mitochondries est moins régulière ; elles présentent des crêtes rayonnantes qui se terminent vers le centre.

Il faut enfin signaler, chez l'embryon de 21 jours, dans les cellules qui contiennent des grains de prozymogène, la présence très fréquente de *centrioles et de cils*. Les centrioles sont situés, soit près du noyau, à proximité de vésicules golgiennes, soit au pôle apical de la cellule, près de la lumière (fig. 22). Ils sont souvent associés par deux, formant un diplosome ; les axes des deux centrioles sont en continuité ou forment un angle faible ; parfois ils sont perpendiculaires l'un à l'autre. Chacun des centrioles est un cylindre de 350 mμ de long sur 170 mμ de diamètre. La paroi du cylindre est formée de 9 tubules parallèles ; il n'y a pas de tubules centraux. Aucune coupe franchement perpendiculaire ne permet de détailler la structure des tubules. Le bord libre des cellules émet fréquemment dans la lumière centro-acineuse de très longs cils; la paroi de ces cils contient des tubules longitudinaux ; nous n'avons pas observé de cor-

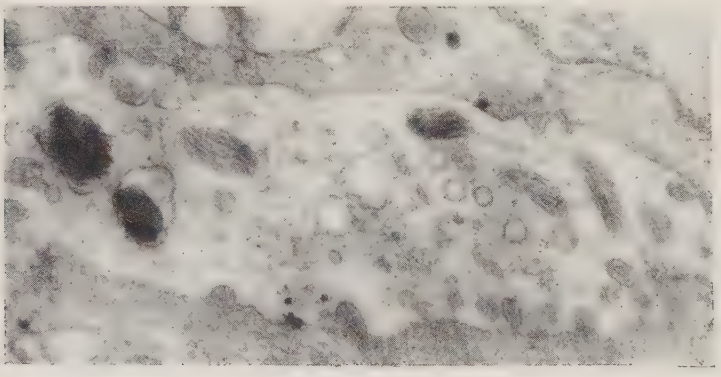


Fig. 23. — Lumière intercellulaire dans le tissu exocrine chez l'embryon de 21 jours. Cils à formations tubulaires longitudinales. Grains libres dans la lumière. × 30.700.

puscules basaux (fig. 23). On voit fréquemment dans les lumières intercellulaires des grains figurés possédant ou non leur enveloppe et des débris cellulaires.

b) La cellule centro-acineuse (fig. 21).

Les cellules centro-acineuses sont souvent groupées par deux ; suivant le plan de la coupe on les observe en bordure ou à proximité d'une lumière. Elles ont en général une forme polygonale et s'insinuent en coin entre les cellules acineuses voisines. Le noyau est gros, à substance granuleuse irrégulière. Le cytoplame très clair ne contient pas de système membraneux, mais des grains de Palade rares groupés en rosettes.

Les mitochondries, rondes ou ovales, sont massives, peu nombreuses et groupées dans la région de l'appareil de Golgi.

L'appareil de Golgi est bien développé. Il est constitué de grosses vacuoles dont le nombre peut atteindre une dizaine. Autour de ces grosses vacuoles se groupent des amas de petites vésicules.

c) La cellule canaliculaire.

Comme la cellule centro-acineuse, elle se distingue de la cellule acineuse par le faible développement de l'ergastoplame et l'absence de grains de sécrétion. Le noyau présente un nucléole proéminent. Le pôle cytoplasmique tourné vers la lumière est arrondi et saillant et émet des microvillosités. Le cytoplasme contient quelques vésicules membraneuses rugueuses et des ribosomes libres peu abondants. Les mitochondries sont rondes ou allongées.

II. — Le pseudo-éosinophile.

Il ne s'agit pas de cellules spécifiquement pancréatiques. Cependant, ces éléments sont extrêmement abondants dans le mésenchyme du pancréas embryonnaire à partir de 7 à 9 jours d'incubation et contiennent des granulations cytoplasmiques très apparentes aux affinités tinctoriales multiples. La présence de ces cellules a donné lieu à confusion. Il est donc indispensable de les identifier avec certitude à l'échelle ultrastructurale.

Le pseudo-éosinophile est une *cellule libre,* dont le cytoplasme périphérique a un contour irrégulier, formant parfois de courts pseudopodes. Le *noyau* présente plusieurs lobes séparés par des étranglements prononcés. Sa substance interne est grossièrement granuleuse et d'une opacité moyenne aux électrons ; la périphérie du suc nucléaire présente des condensations étendues de matériel beaucoup plus opaque (fig. 24).

Les *granulations* sont polymorphes à l'intérieur d'une même cellule.

Leur taille est très variable : les plus grosses, de forme ovale, atteignent 0,55 μ sur 0,4 μ, tandis que les plus petites ont un diamètre de 80 mμ. Les petites granulations sont formées d'une substance homogène très contrastée ; au contraire, les grosses contiennent une substance à contraste moyen disposée en un réseau aux mailles grossières ; les plus volumineuses présentent souvent des plages irrégulières de substance dense alternant avec des plages très claires ; il pourrait s'agir d'un artefact, nos conditions de fixation et d'inclusion conviendraient mal à ces granulations. Certaines des granulations ne sont pas rondes mais allongées avec un contour anguleux. Les petites granulations présentent une enveloppe membraneuse net-

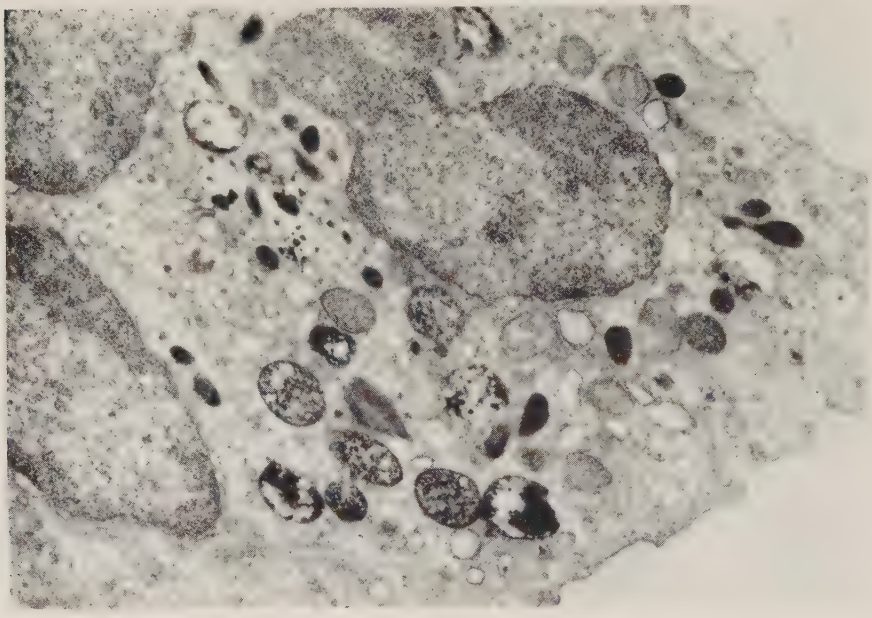


Fig. 24. — Pseudo-éosinophile chez l'embryon de 21 jours. Noyau polylobé. Granulations polymorphes. × 9.000.

tement distincte de la substance interne ; les grosses, par contre, ne montrent pas de vraie membrane, mais plutôt une condensation périphérique de la substance interne.

L'*appareil de Golgi* est constitué de quelques saccules et de petites vacuoles. L'*ergastoplasme* est représenté essentiellement par des grains de Palade libres, en quantité moyenne, mais aussi par quelques vésicules membraneuses rondes de la variété rugueuse.

Les *mitochondries* sont rondes ; leur diamètre varie de 0,25 à 0,35 μ ; leur contenu interne est assez dense, et les crêtes peu nombreuses.

III. — La cellule A.

Elle est caractérisée par ses granulations extrêmement typiques et par son cytoplasme dense aux électrons, relativement pauvre en autres organites (fig. 25).

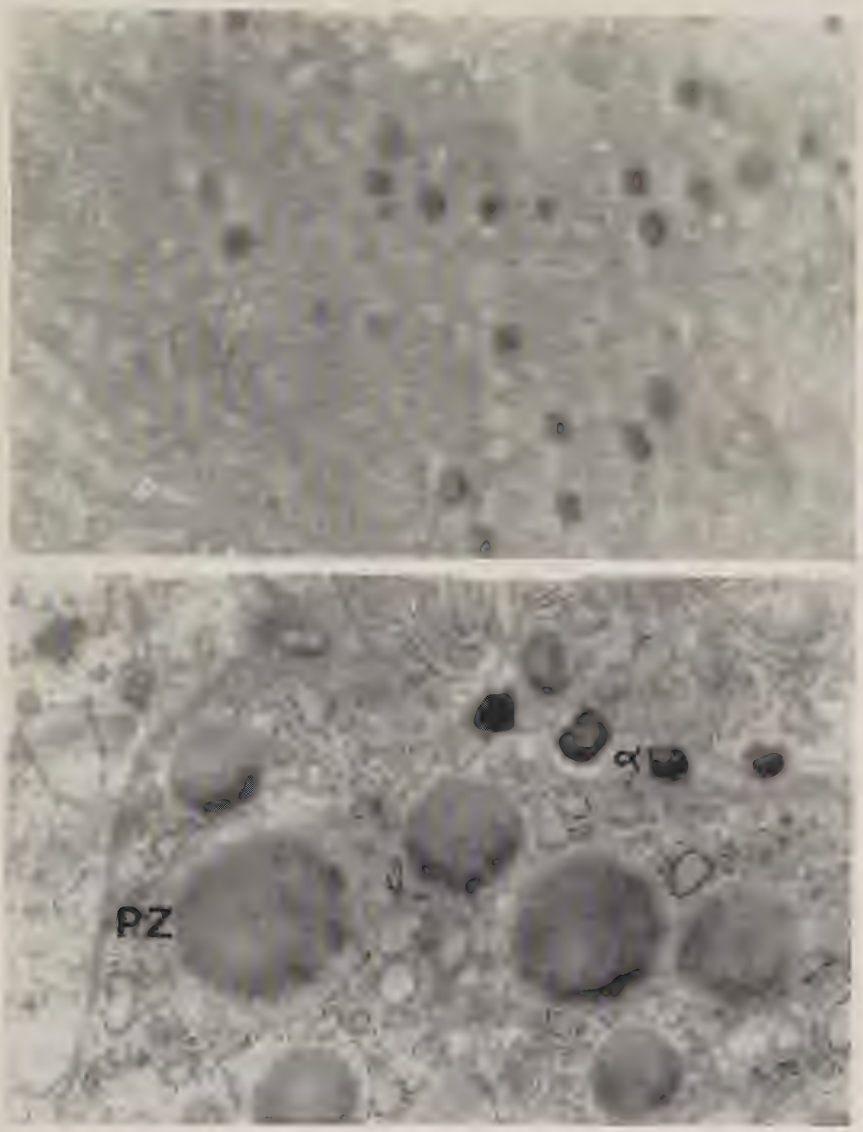


Fig. 25. — Cellules A. Embryon de 21 jours. Granulations α à substance interne dense, à sac membraneux large. Cytoplasme vacuolaire. × 14.400.

Fig. 26. — Grains α dans une cellule exocrine (ergastoplasme lamellaire). Embryon de 21 jours. P. Z. = grains de prozymogène. × 22.400.

Les granulations α sont rondes, leur diamètre varie entre 150 et 380 mμ. Elles sont constituées d'une substance interne très dense aux électrons, d'apparence parfois granuleuse, et entourées d'une enveloppe membraneuse fine, nettement contrastée ; un espace clair de 250 Å sépare la substance interne de l'enveloppe ; cet espace n'a pas une apparence vide, mais semble formé d'une substance très peu dense aux électrons.

Le cytoplasme, très dense, contient peu de différenciations, surtout dans la zone riche en granules ; ces différenciations sont surtout des vésicules membraneuses à contenu clair ; fréquemment ces vacuoles sont de taille analogue à celle des granulations α.

Les mitochondries, massives, présentent un contour sinueux et des crêtes transversales serrées ; elles sont généralement repoussées le long des membranes intercellulaires. L'appareil de Golgi est constitué essentiellement de microvésicules et de vacuoles claires ; la composante sacculaire est très réduite.

Le noyau, de forme régulière, contient un nucléoplasme très homogène, finement grenu et montre parfois un nucléole discret.

IV. — La cellule B.

Les îlots B occupent une place restreinte dans le parenchyme pancréatique. C'est dans les fragments prélevés à l'extrémité apicale du lobe splénique qu'on les trouve le plus facilement. Ces îlots sont situés en contact direct avec les cellules exocrines dont ils ne sont pas séparés par une capsule conjonctive. Des capillaires sont fréquemment associés à ces îlots.

Nous décrirons la cellules B d'après des images provenant du Poussin de 5 jours et de l'embryon de 21 jours.

a) Le *noyau* est rond ou ovale, de forme régulière ; il contient une substance grenue, relativement homogène, présentant parfois de petits amas un peu plus denses ; il n'y a pas de nucléole marqué. La membrane périnucléaire est double, les deux composantes ménageant un espace irrégulier de 250 Å d'épaisseur en moyenne. Nous n'avons pas trouvé d'images de continuité entre la composante externe de la membrane périnucléaire et les systèmes membraneux du cytoplasme.

b) Le *cytoplasme* présente un système membraneux remarquable et des granules de sécrétion en aiguilles (fig. 27 et 28).

Le système de membranes forme un réseau discontinu qui occupe de grandes portions du cytoplasme. Les membranes sont simples, elles délimitent de grandes vésicules polygonales ou rondes, fermées ou ouvertes, souvent disposées en chapelet. Il arrive que deux vésicules voisines communiquent. Souvent les vésicules sont largement ouvertes et leur contenu communique directement avec le cytoplasme environnant. Leur diamètre moyen est d'environ 400 à 600 mμ. A l'intérieur des vésicules, enrobés dans un matériau de densité analogue à celle du cytoplasme environnant,

se trouvent des organites d'aspect polymorphe. On peut distinguer une filiation évidente entre ces différents aspects qui constituent des étapes de l'élaboration des grains :

1. — Certaines vésicules sont complètement remplies par un matériel finement grenu, un peu plus dense aux électrons que le cytoplasme ; dans cette forme, que nous considérons comme la première étape, il n'y a aucun espace entre le matériau interne de la vésicule et sa membrane périphérique. Ces vésicules sont en rapport étroit avec l'appareil de Golgi (fig. 28, 1).

2. — Certaines vésicules contiennent un matériel plus dense que les précédentes, moins homogène, et qui est séparé de la membrane limitante par un espace clair de 400 à 600 Å (fig. 28, 2).

3. — Enfin, certaines vésicules contiennent des faisceaux d'aiguilles cristallines qui sont les grains β définitifs. Ces aiguilles de 200 à 500 mμ de long sur 100 à 150 mμ de large sont rectangulaires ou effilées aux extrémités en coupe longitudinale, triangulaires ou losangiques en coupe transversale ; elles sont associées en faisceaux, parfois en bâtonnets compacts qui flottent à l'intérieur de la vésicule. Suivant le plan de la coupe et sa hauteur par rapport aux grains les vésicules apparaissent bourrées de cristaux compacts, ou contiennent quelques grains punctiformes épars, ou parfois encore sont vides de matériel dense (fig. 28, 3).

4. — Certains de ces cristaux sont contenus dans une enveloppe très particulière, isolée par rapport au réseau de membranes que nous avons décrit plus haut. Cette enveloppe atteint 0,1 μ d'épaisseur. De forme ronde ou ovale elle est constituée d'une série de membranes concentriques ; en fait il semble plutôt s'agir d'une membrane enroulée sur elle-même de manière irrégulière, si bien qu'il n'est pas possible d'en suivre la continuité ; en effet, les différents tours de la spire, s'il s'agit bien d'une membrane enroulée, se rapprochent parfois jusqu'à se confondre ; certaines zones paraissent plus épaisses que d'autres, ce qui pourrait provenir de la fusion de deux tours de la spire. Enfin, la membrane porte de très petits granules denses en assez grand nombre ; ces grains sont légèrement plus petits que les grains de Palade et apparaissent tantôt superposés, tantôt accolés à la membrane. L'ensemble de cette enveloppe et du grain β cristallin qui y est enfermé constitue un organite de grande taille (jusqu'à 0,6 μ de diamètre) absolument caractéristique de la cellule B (fig. 28, 4).

5. — Enfin, assez fréquemment des grains cristallins, d'aspect définitif, sont libres dans le cytoplasme, sans enveloppe d'aucune sorte.

Quel est le rôle de la vésicule membraneuse périgranulaire et de l'enveloppe spiralée dans l'élaboration du grain ? Notons seulement que la membrane simple peut contenir tous les stades de condensation du grain ; au contraire, nous n'avons observé la membrane épaissie qu'autour de certains grains cristallins.

L'appareil de Golgi est extrêmement discret, composé de 2 à 5 saccules très plats et très fins et de vésicules lisses, petites et peu nombreuses (fig. 27). Parmi celles-ci on en trouve d'autres qui contiennent un matériel moyennement dense et qui semblent représenter des stades d'élaboration des grains β décrits plus haut. Les plus petites et les moins denses de ces vésicules apparaissent au niveau de l'empilement

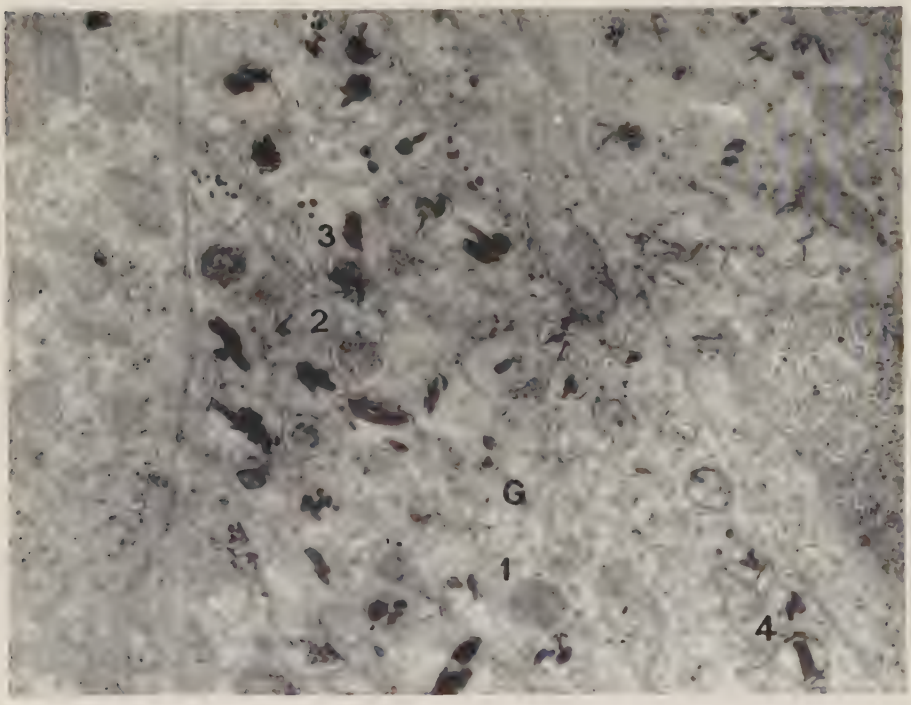


Fig. 27. — Cellules β chez l'embryon de 21 jours. G. = appareil de Golgi. 1, 2, 3, 4 = différents stades d'élaboration des grains β. × 14.875.

Fig. 28. — Schéma de l'élaboration des grains β. V. G. = vésicules golgiennes. *1* = vésicules à contenu faiblement opaque aux électrons, situées parmi les vésicules golgiennes. *2* = vésicules à contenu plus dense aux électrons, moins homogène et contracté à l'intérieur de l'enveloppe membraneuse. *3* = grains cristallins à enveloppe large. *4* = grain cristallin à enveloppe membraneuse complexe.

des saccules, tandis que les plus grosses et les plus denses se trouvent aux extrémités latérales des saccules. Ces vésicules associées à l'appareil de Golgi sont toujours du type le moins élaboré : matériel interne à densité moyenne emplissant complètement l'enveloppe membranaire. On peut en déduire qu'un certain stade de l'élaboration du grain est en rapport avec l'appareil de Golgi.

Les grains de Palade sont peu abondants, rarement associés à des membranes, mais plutôt libres et groupés en rosettes.

Les mitochondries de grande taille sont de forme très allongée, de contour irrégulier souvent anguleux. Leurs dimensions atteignent 800 mμ à 1 μ de long sur 90 mμ de large. La matrice mitochondriale est assez dense, les crêtes sont irrégulières, longitudinales et sinueuses, parfois obliques par rapport au grand axe de la mitochondrie. Avec les grains cristallins et leur système de membranes, ces mitochondries longues et anguleuses constituent un des traits caractéristiques de la cellule B (fig. 70).

V. — Les cellules mixtes.

A la limite entre les zones exocrine et endocrines, on trouve de manière constante chez l'embryon de 21 jours des cellules qui contiennent des granulations de plusieurs types dans un cytoplasme commun (fig. 26 et 29 à 33).

Le cas le plus fréquent est le mélange de grains de zymogène avec des grains α. Les cellules présentent alors un cytoplasme de type exocrine avec un ergastoplasme bien développé (fig. 30). Mais assez souvent, cet ergastoplasme a une apparence désorganisée : les citernes plus petites, moins abondantes, ne forment plus un système cohérent, mais sont disposées en désordre (fig. 29). Les grains des deux types se distinguent aisément :

— grains α de 0,2 μ à 0,3 μ de diamètre, à substance interne très dense et enveloppe membraneuse large.

— grains Z de 0,7 à 1 μ de diamètre, à substance interne plus faiblement contrastée et membrane étroitement appliquée ; parfois aussi grains de prozymogène à écorce claire.

Les cellules mixtes de cette catégorie constituent de vastes zones homogènes.

On trouve également le mélange des grains Z avec des grains β cristallins typiques, dans un cytoplasme commun. Mais à la différence du cas précédent, de tels mélanges ne s'observent que dans des aires cytoplasmiques limitées, strictement localisées à la frontière entre une cellule B et une cellule exocrine contiguë. Là également, les granulations sont caractéristiques par leur aspect et leur taille et sont étroitement entremêlées (fig. 33).

Il arrive même qu'on trouve côte à côte des grains Z (ou de prozymo-

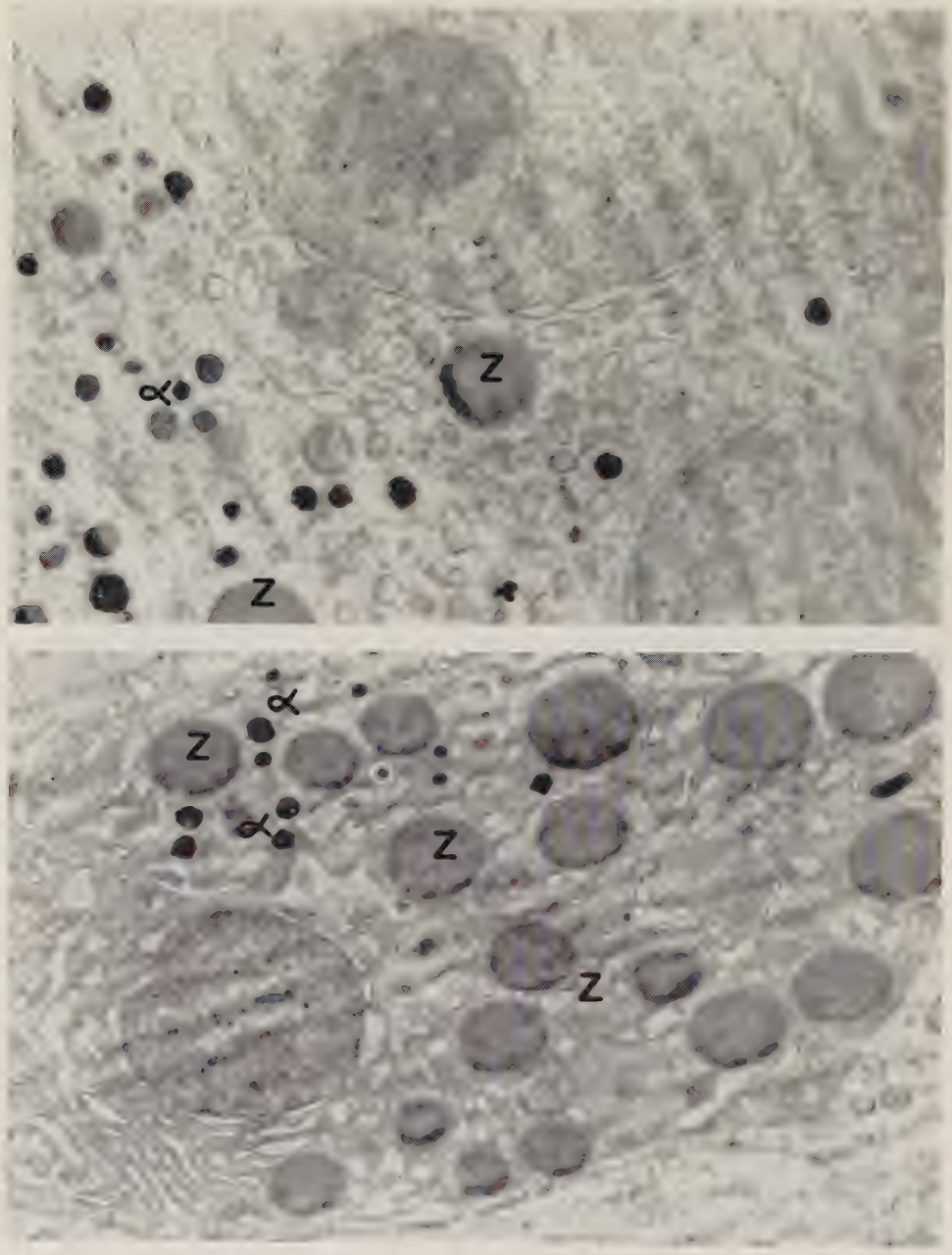


Fig. 29 à 33. — *Cellules mixtes chez l'embryon de 21 jours.*

Fig. 29. — Cellule exocrine contenant des grains Z. et des grains α. Ergastoplasme désorganisé. × 14.230.

Fig. 30. — Cellule exocrine contenant des grains Z. et des grains α dans un ergastoplasme bien organisé. × 9.920.

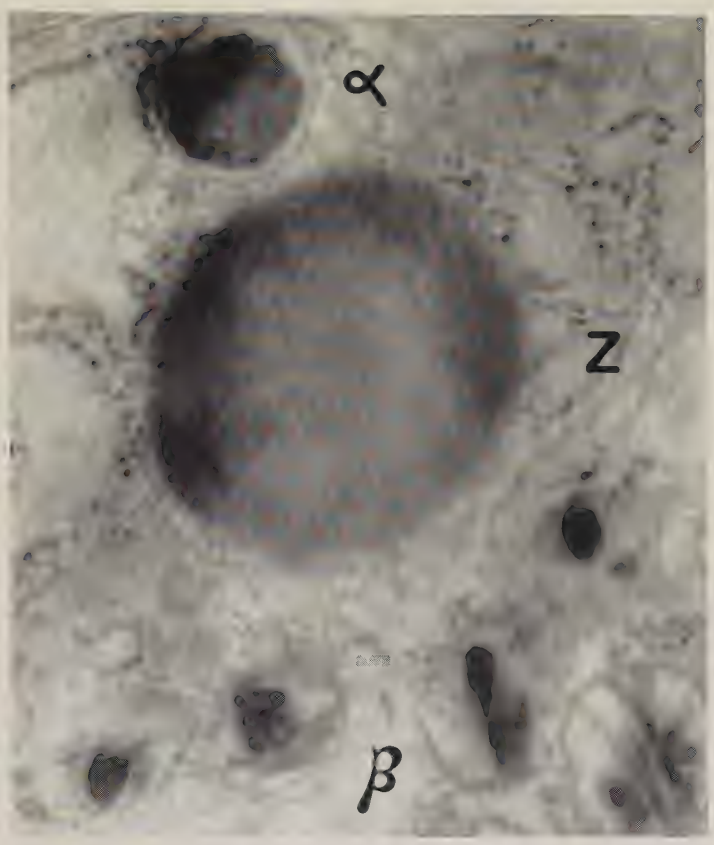


Fig. 31. — Détail du voisinage entre un grain Z. et un grain α (cytoplasme de type exocrine). Les grains β dans le bas de l'image sont situés dans une autre cellule. × 61.875.

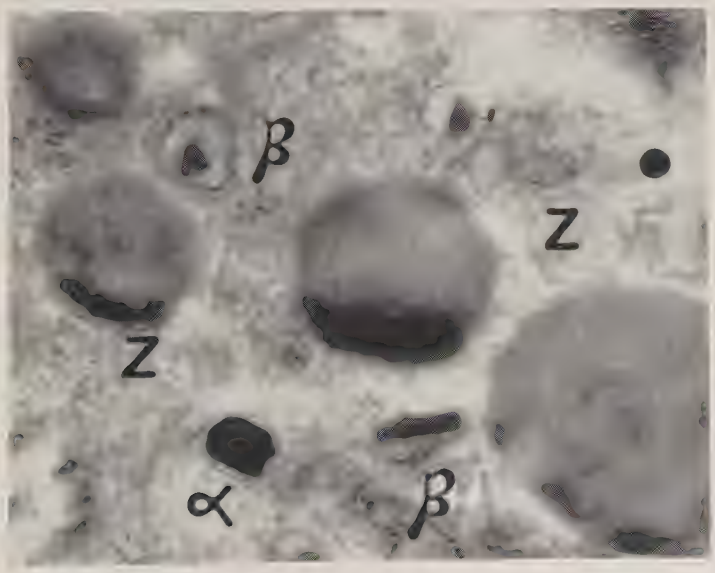


Fig. 32. — Mélange de grains Z., α et β dans un même cytoplasme. × 33.185.

gène), des grains α et des grains β à sac membraneux multiple dans une même cellule (fig. 32).

Enfin, il existe également des cellules à cytoplasme de type endocrine, qui montrent à la fois des grains α et des grains β.

Ces deux dernières catégories de cellules mixtes se rencontrent aux carrefours entre les tissus endocrines et exocrine respectifs.

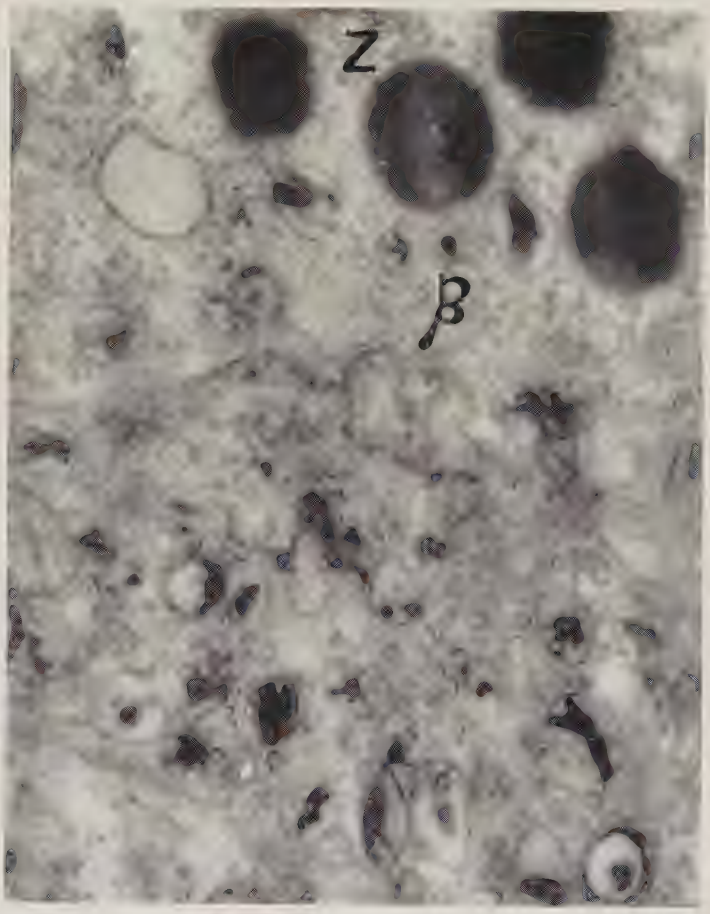


Fig. 33. — Mélange de grains Z. et de grains β, dans une cellule exocrine voisine d'une cellule B. × 30.500.

Les cellules mixtes ont été observées dans tous les pancréas d'embryons de 21 jours que nous avons examinés, et semblent correspondre étroitement à cette étape particulière de la différenciation, où les cellules exocrines et endocrines perdent définitivement leurs caractères embryonnaires. Nous verrons en effet, dans le chapitre suivant, qu'à 18 jours, dernier stade embryonnaire que nous avons étudié, la cyto-différenciation n'est pas achevée.

CHAPITRE II

DIFFÉRENCIATION DES TYPES CELLULAIRES CHEZ L'EMBRYON

Les cellules indifférenciées de l'ébauche pancréatique constituent soit un parenchyme homogène (jusqu'à 7 jours, c'est l'aspect général du pancréas), soit des tubules constitués d'une seule assise de cellules épithéliales délimitant une vaste lumière, entourées de cellules mésenchymateuses. A partir de 7 jours, on trouve plutôt le premier type dans le lobe splénique et les tubules dans la courbure de l'anse duodénale. Les caractères des cellules sont identiques. Le noyau est très volumineux et présente un gros nucléole contrasté. Le cytoplasme peu abondant forme une couronne autour du noyau et présente des caractères embryonnaires typiques :

— pas de système de membranes, à l'exception de quelques citernes plates, assez rares ; ribosomes en rosettes ; appareil de Golgi représenté par des essaims de petites vésicules denses ; mitochondries peu abondantes, épaisses (0,6 à 1 μ sur 0,3 μ) à crêtes transversales ; gros corps lipidiques étoilés ; corps multivésiculaires fréquents ; grosses vacuoles sans membrane limitante.

I. — La différenciation du tissu exocrine.

A partir de 14 jours le cytoplasme, plus abondant, présente des signes discrets de différenciation : l'ergastoplasme est représenté par quelques éléments membranaires qui forment des vésicules à contenu clair, entourées de grains de Palade. Ces vésicules ont un diamètre de 100 à 300 mμ de diamètre. L'appareil de Golgi montre une simple ou une double rangée de saccules minces et allongés, entourés à chaque extrémité de petites vésicules et de quelques grosses vacuoles à contenu clair de 200 à 370 mμ de diamètre. Les mitochondries appartiennent au type exocrine par leur forme renflée. Enfin, il existe des grains de sécrétion en petit nombre. Leurs dimensions sont de 300 mμ sur 500 mμ environ. Ils sont formés d'une substance dense aux électrons, enveloppée d'une membrane fine, étroitement accolée.

Entre 16 et 18 jours (fig. 34 à 37) la différenciation exocrine devient caractéristique, tout en conservant des caractères embryonnaires : l'ergastoplasme, encore rare, commence à s'organiser (fig. 34) ; les membranes, flanquées de grains de Palade, délimitent des citernes plates, indépendantes les unes des autres ; fréquemment ces citernes sont alignées le long des parois cellulaires, laissant le reste du cytoplasme libre. On observe également quelques vésicules rondes, entourées de grains de Palade.

L'appareil de Golgi (fig. 35) se développe et comporte en général 4 à 5 saccules plats, empilés, quelques vésicules claires, une accumulation de petites vésicules à contraste interne moyen et de grosses vacuoles.

Les grains de zymogène atteignent 0,6 μ de diamètre et sont un peu plus nombreux qu'aux stades précédents, tout en restant clair-

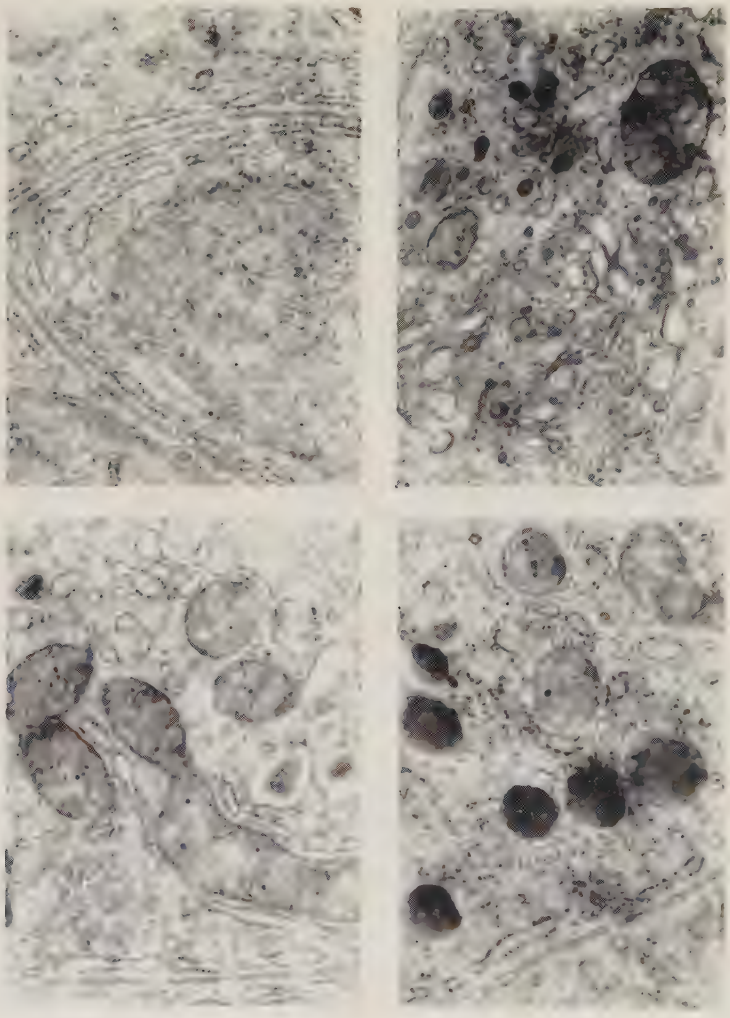


Fig. 34 à 37. — *Le tissu exocrine chez l'embryon de 18 jours.*

Fig. 34. — Début d'organisation ergastoplasmique. × 7.200.

Fig. 35. — Appareil de Golgi développé à grosses vacuoles. × 16.875.

Fig. 36. — Présence de vacuoles à contenu interne non homogène. Grosses mitochondries. Ribosomes libres abondants. × 14.580.

Fig. 37. — Grains Z. ou P. Z. de petite taille. × 19.440.

semés (fig. 37). On observe également des grains de prozymogène et de grosses vacuoles dont le contenu est inégalement dense aux électrons ; ces grosses vacuoles ressemblent aux grains de prozymogène et représentent sans doute un stade d'élaboration antérieur (fig. 36).

En conclusion, le trait essentiel du pancréas exocrine de 18 jours est le caractère embryonnaire du cytoplasme. Quelques citernes sont formées mais ne constituent pas le système cohérent que l'on trouve 3 jours plus tard. Les grains de sécrétion sont peu abondants. C'est donc entre 18 et 21 jours que la différenciation du tissu exocrine, ébauchée jusqu'alors, s'accomplit réellement, puisque chez l'embryon prêt à éclore il existe du tissu acineux de type adulte.

II. — La différenciation du tissu endocrine A.

1° *L'ébauche dorsale du pancréas chez l'embryon de 3 jours.* Il s'agit d'embryon au stade 19 de Hamburger et Hamilton, c'est-à-dire un stade où on distingue nettement l'ébauche dorsale du pancréas (1re partie) qui est alors un bourgeon épithélial creusé d'un court diverticule de la cavité intestinale.

Au microscope électronique, on trouve effectivement une vaste cavité centrale entourée de cellules à organites de type embryonnaire, tandis que les assises de cellules situées au fond du bourgeon, également d'apparence embryonnaire, contiennent des grains de sécrétion.

a) La cavité centrale du bourgeon et ses cellules bordantes (fig. 38).

La lumière du bourgeon contient un matériel réticulaire ; à un certain endroit, on observe dans ce matériel des condensations annulaires plus opaques aux électrons. Le cytoplasme des cellules bordantes de la lumière est du type embryonnaire : il contient surtout des grains de Palade libres en rosette, quelques rares vésicules membraneuses rugueuses, des mitochondries rondes ou ovales (0,4 sur 0,5 μ), un appareil de Golgi vésiculeux, parfois des corps multivésiculaires. Nous insisterons sur ces caractères à propos des cellules élaboratrices du fond du bourgeon. De toutes façons les cellules qui entourent la lumière ne contiennent aucun grain de sécrétion, ni organite spécifique.

Les membranes intercellulaires présentent fréquemment des différenciations spéciales : barres terminales et desmosomes (fig. 38, 39, 40, 41). Les barres terminales sont situées entre deux cellules voisines au niveau de la lumière. Ce sont des bandes de matériel dense, amorphe, de chaque côté des feuillets de la membrane plasmique ; l'espace intercellulaire diminue de largeur au niveau de ces bandes, si bien que les deux feuillets apparaissent souvent confondus. Dans le cas général, la barre terminale

est perpendiculaire à la surface bordante de la lumière ; mais souvent on observe une telle différenciation parallèlement à la surface bordante, isolant ainsi une étroite bande de cytoplasme vers la lumière ; dans d'autres

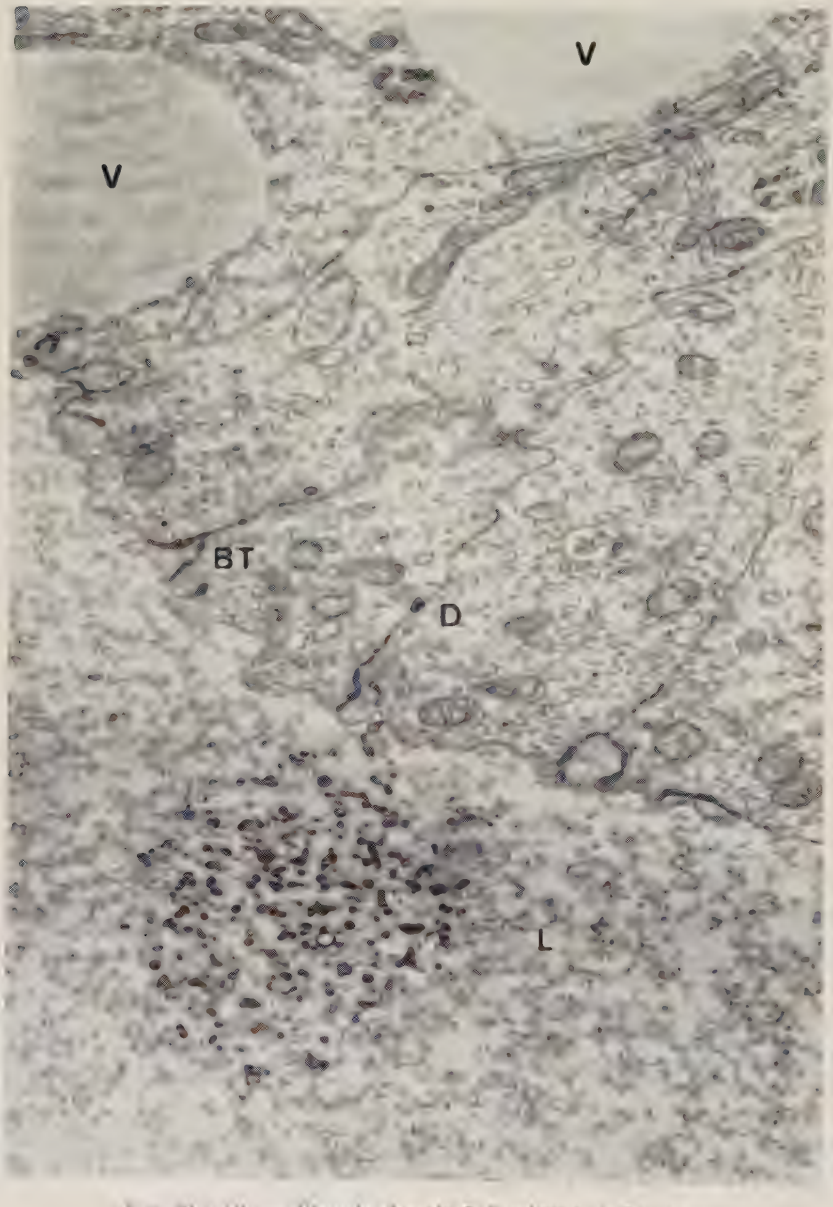


Fig. 38. — Cellules bordant la cavité centrale. Matériel réticulaire dense aux électrons dans la lumière (L.). Présence de desmosomes (D.), de barres terminales (B. T.), de grosses vacuoles (V.). Pas de grains de sécrétion. × 10.320.

cas la double membrane plasmique bifurque juste avant la lumière et la fourche ainsi formée, épaissie en barre terminale, isole un carrefour de cytoplasme triangulaire en bordure de la lumière. Par ailleurs, les membranes intercellulaires présentent encore d'autres différenciations ; ces membranes sont souvent sinueuses et forment de temps en temps des circonvolutions compliquées (fig. 40). Fréquemment elles portent des desmosomes, souvent situés vers la cavité, à peu de distance derrière les barres terminales, mais également en position quelconque, en particulier entre les cellules internes du bourgeon. Ce sont des condensations de matériel très opaque de chaque côté des deux membranes plasmiques ; dans un cas favorable on observe même un dédoublement de chacun des feuillets ; on a ainsi une quadruple membrane entourée d'un manchon très dense ; autour du manchon se trouvent des fibrilles ; la distance

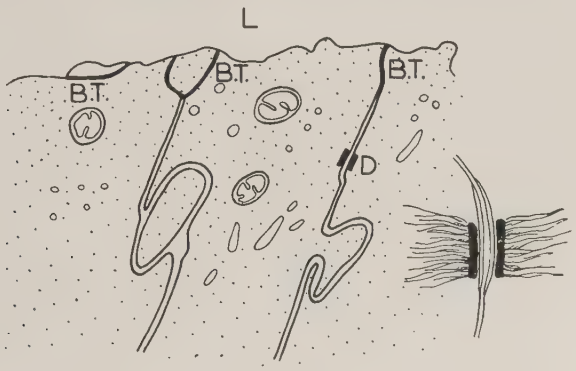


Fig. 39. — Schéma des différenciations de la membrane plasmique dans le bourgeon dorsal de l'embryon de 3 jours. L. = lumière ; B.T. = barre terminale ; D. = desmosome ; A droite, schéma plus détaillé de l'aspect d'un desmosome.

entre les deux membranes plasmiques est légèrement agrandie à la hauteur du desmosome. C'est chez l'embryon de 3 jours qu'on observe ces différenciations membraneuses avec la plus grande fréquence.

Le cytoplasme des cellules bordantes envoie à l'intérieur de la lumière des microvillosités, relativement peu fréquentes d'ailleurs. Parfois, ces microvillosités sont de taille plus importante (1 μ de long sur 0,4 μ de diamètre) et un centriole se trouve à leur base ; il s'agit alors d'un bourgeon ciliaire dont le centriole doit représenter le corpuscule basal et participer à la genèse du cil ; on trouve également des cils déjà formés pourvus de 9 tubules périphériques, mais privés de tubules axiaux.

Fréquemment, les cellules sont envahies de grandes vacuoles, sans membrane limitante, qui vont jusqu'à remplir toute la cellule, faisant ainsi disparaître le cytoplasme ; ces vacuoles sont formées d'une substance non structurée, faiblement opaque et sont simplement entourées d'une condensation cytoplasmique (fig. 38 et 41).

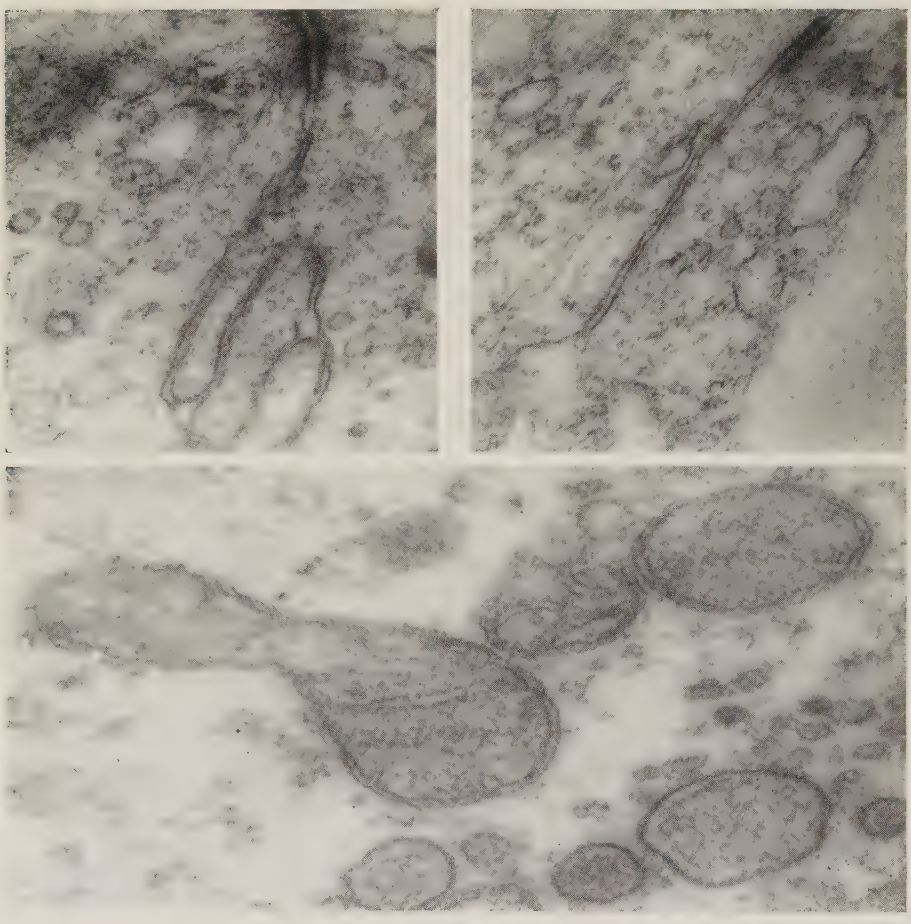


Fig. 40. — Détail d'un desmosome et des circonvolutions de la membrane plasmique. × 41.180.

Fig. 41. — Desmosome. Bord d'une vacuole. × 49.375.

Fig. 42 à 44. — *Détail des mitochondries.*

Fig. 42. — Mitochondries pauvres en crêtes. Organites à membrane périphérique simple mais à contenu interne analogue à celui des mitochondries. × 56.560.

b) ***Les cellules du fond du bourgeon*** (fig. 45 à 50).

Le caractère frappant des cellules internes de l'ébauche pancréatique la plus primitive, c'est la *présence de grains de sécrétion* (fig. 45 à 50). Ces grains existent en petite quantité dans d'assez nombreuses cellules ; de temps en temps, on trouve même une cellule qui en contient beau-

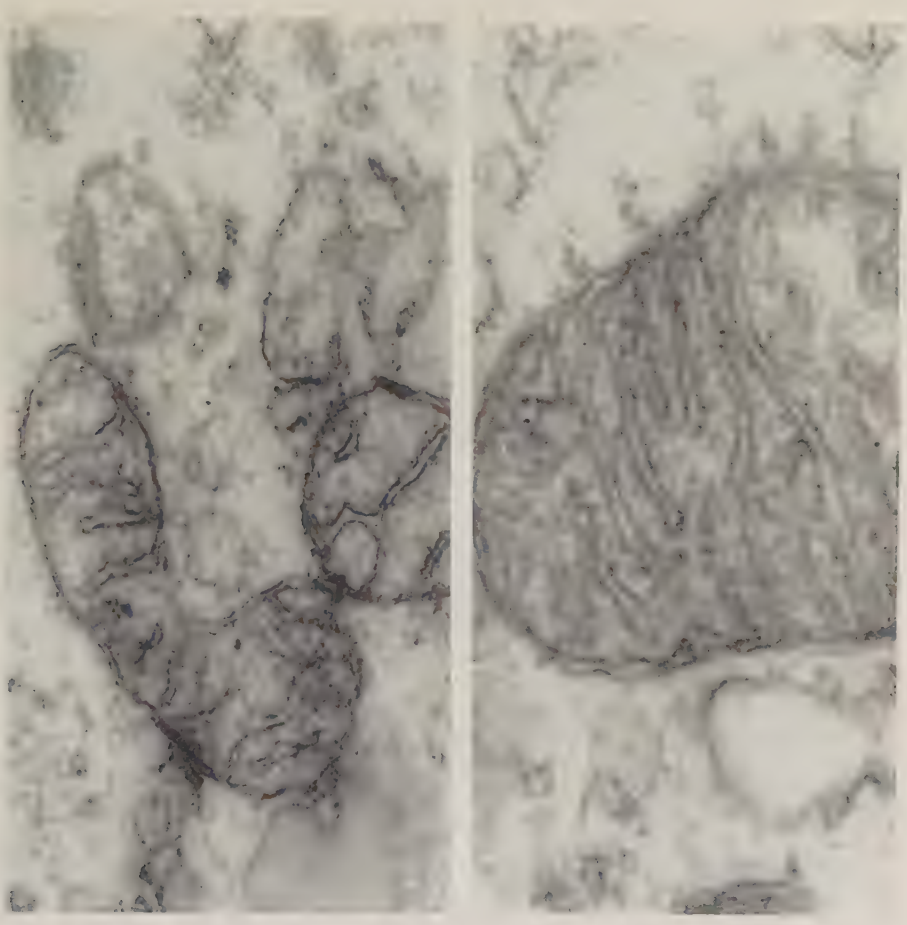


Fig. 43 et 44. — Mitochondries à crêtes plus ou moins abondantes. × 48.450 et × 78.000.

coup ; la présence de ces grains n'est donc pas exceptionnelle ; de plus, c'est de manière constante qu'on les trouve dans les ébauches de ce stade.

Ces granulations ont une taille moyenne de 100 à 150 mμ ; elles sont constituées d'un granule central arrondi ou ovale, d'une forte densité aux électrons ; ce grain est enrobé dans une substance faiblement opaque, mais nettement plus dense aux électrons que le cytoplasme, et qui forme un anneau de 100 Å d'épaisseur en moyenne ; l'ensemble est limité par une enveloppe membraneuse simple. C'est la structure typique des grains α. Seule leur taille est inférieure à celle des grains plus âgés ; l'écorce périphérique est également plus mince ; en outre, on observe de petites variations par rapport au grain type : l'enveloppe est souvent plissée ; parfois elle n'est pas fermée, ses bords libres s'enroulent alors vers l'intérieur (fig. 48). Il pourrait s'agir d'un artefact, mais c'est un aspect typique de ce stade,

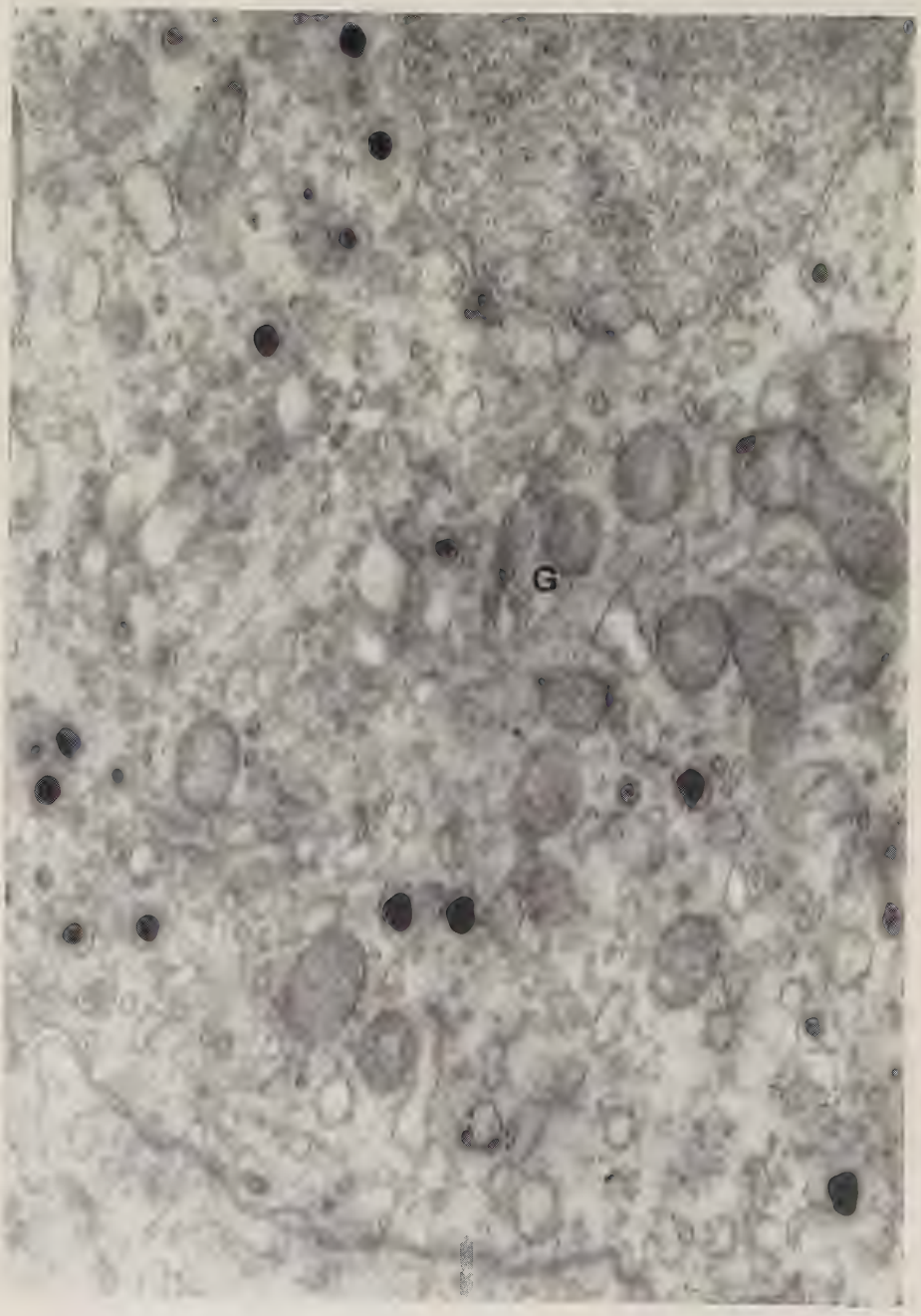


Fig. 45. — Cellule du fond du bourgeon à grains α. La membrane externe des grains paraît souvent ouverte. Appareil de Golgi (G.) développé. × 38.200.

qu'on retrouve rarement chez des embryons plus âgés. Cet aspect peut s'expliquer par certaines images golgiennes que nous décrirons plus loin. Il arrive aussi que l'enveloppe soit hérissée de corpuscules. Il pourrait s'agir de grains de Palade (fig. 49). Parfois, le grain interne n'a pas de contour régulier, mais apparaît échancré ; il est alors noyé dans la substance moyennement opaque de l'écorce (fig. 47).

Le cytoplasme de ces cellules pancréatiques primitives, malgré la présence de grains de sécrétion, est celui de cellules embryonnaires, L'*ergastoplasme* est représenté principalement par des ribosomes libres ; on trouve cependant des vésicules rugueuses (diamètre moyen : 160 mμ) plus abondantes que dans les cellules indifférenciées qui bordent la cavité du bourgeon.

L'*appareil de Golgi* et les organites qu'on peut lui rattacher sont importants dans ces cellules. Les organites annexes sont de toutes petites vésicules (40 mμ de diamètre), à contenu moyennement dense et de grosses vacuoles (150 mμ de diamètre) emplies d'une phase très claire ; ces formations sont abondantes surtout dans la région golgienne mais se retrouvent un peu partout dans la cellule. L'appareil de Golgi lui-même est bien développé ; des saccules longs et plats, régulièrement empilés par trois ou quatre en constituent le centre (fig. 45 et 50). Ces saccules se dilatent à leurs extrémités en grosses vacuoles à contenu clair. Nombreuses sont les images d'association entre l'appareil de Golgi et les grains de sécrétion (fig. 50). Soit relations de voisinage, les grains étant situés parmi les vésicules golgiennes, soit association réelle, l'extrémité dilatée d'un saccule enfermant un grain de sécrétion et son écorce, les images suggèrent que l'enveloppe des grains est une différenciation golgienne. La fréquence des relations entre appareil de Golgi et grains de sécrétion semble coïncider avec un stade précoce d'élaboration des grains.

Les mitochondries montrent des variations de structure interne (fig. 42 à 44) qui semblent traduire leur formation à partir d'un organite simple. Rondes ou allongées, elles sont toujours épaisses. Dans la forme la moins élaborée, le caractère qui permet d'identifier la nature mitochondriale de l'organite est la double membrane externe ; mais il n'y a pas de crêtes internes (fig. 41) ; l'intérieur de l'organite est constitué par une substance moyennement opaque aux électrons et finement granuleuse ; on trouve côte à côte tous les intermédiaires entre ces structures et des mitochondries à crêtes serrées (fig. 42 et 43) ; la matrice interne a un aspect très constant dans toutes ces formes et avec la double membrane périphérique permet l'identification des formes les plus frustes. A côté de ces organites plus ou moins complexes qu'on peut classer avec assez de certitude, on trouve des structures de taille analogue qui sont entourées d'une membrane *simple* et dépourvues de membranes internes ; la substance interne de ces structures ressemble beaucoup à la matrice des mitochondries ; il pourrait s'agir de formes encore plus primitives dans la genèse des mitochondries ; cependant, il est difficile de l'affirmer.

En conclusion, l'ébauche pancréatique dorsale de l'embryon de 3 jours contient non seulement des organites banaux en voie de différenciation, mais encore des grains de sécrétion spécifiques. L'ébauche est donc déjà spécialisée à l'échelle intracellulaire. Y a-t-il vraiment une différenciation chimique spécifique ? Le chapitre expérimental nous apportera au moins une réponse partielle.

Plusieurs arguments permettent d'affirmer qu'il s'agit de grains α :

1) La localisation correcte de l'ébauche dorsale, très petite à ce stade, est vérifiée par l'histologie à l'échelle optique et par l'évolution de l'ébauche explantée en culture (cf. 3e partie).

2) Les grains ont les mêmes caractères morphologiques que les grains α des cellules différenciées et on les retrouve d'une manière continue à tous les stades embryonnaires ultérieurs avec des dimensions croissantes.

2° *Les îlots A de l'embryon de 4 à 7 jours.* Dans les champs cellulaires indifférenciés de 4 jours (fig. 51), 5 et 6 jours, on trouve des groupes de cellules qui contiennent des grains de sécrétion. A 7 jours, la disposition des cellules A en îlots devient évidente. Les granulations sont typiques et mesurent jusqu'à 150 ou 200 mμ de diamètre. Le cytoplasme de ces cellules est analogue à celui des cellules banales ; toutefois, les vésicules rugueuses sont un peu plus abondantes et l'appareil de Golgi est beaucoup plus développé ; il a une forme semi-circulaire et est composé de saccules petits et très plats, d'abondantes microvésicules et de quelques petites vacuoles. Il y a de nombreux grains de sécrétion dans la région golgienne.

La différenciation des îlots A à ces stades ne montre donc pas une évolution particulière. Mais leur étude permet de constater la présence de grains α d'une façon constante.

3° *Les îlots A chez l'embryon de 9 jours* (fig. 52). On a observé à ce stade des images particulières. Il existe parfois des différenciations ergastoplas-

Fig. 46. — Cytoplasme d'une cellule A à grains serrés. Embryon de 3 jours. × 39.600.

Fig. 47. — Grain échancré, typique de l'embryon de 3 jours (flèche). × 23.950.

Fig. 48. —Variation de l'enveloppe du grain α chez l'embryon de 3 jours, bords libres et enroulés vers l'intérieur. × 38.810.

Fig. 49. — Autre variation habituelle de l'enveloppe du grain α chez l'embryon de 3 jours : ici elle est hérissée de granules. × 50.000.

Fig. 50. — Embryon de 3 jours. Élaboration de grains α à l'intérieur de l'appareil de Golgi. D'après cette image, l'enveloppe membraneuse des grains α semble bien être une différenciation golgienne. × 64.260.

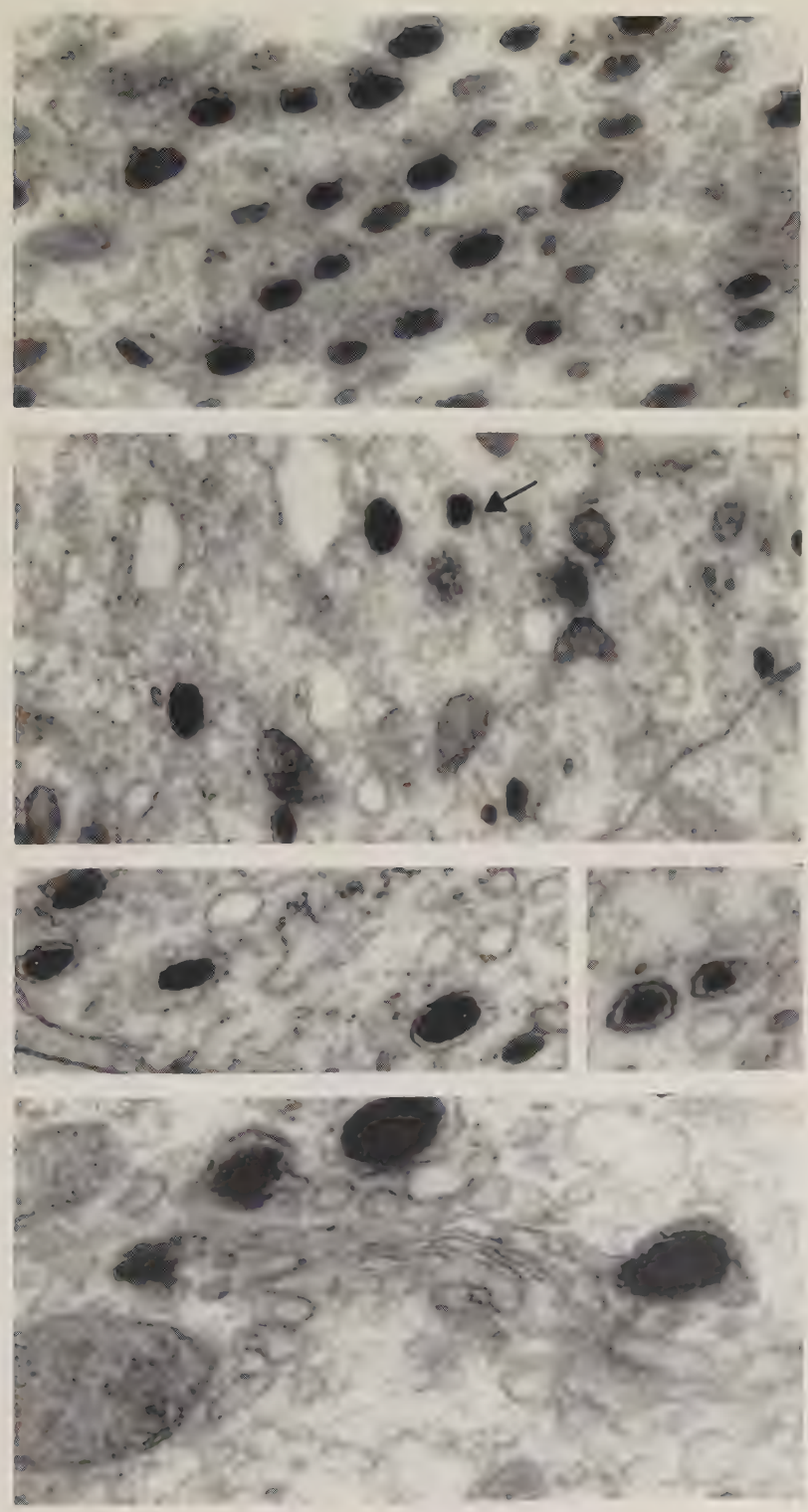


Fig. 48 à 50. — *Détail des grains* ×

miques très localisées (fig. 54) ; ce sont des doubles membranes parallèles disposées en série : chaque double membrane forme de petites citernes par une série d'étranglements et d'élargissements successifs. La face cytoplasmique des doubles membranes porte des ribosomes rigoureusement alignés. A l'extrémité de la structure, certaines des doubles membranes semblent s'ouvrir dans le cytoplasme ; pour d'autres au contraire, on voit nettement que les deux feuillets se rejoignent, isolant la citerne par rapport au cytoplasme.

Les mitochondries sont analogues à celles des stades antérieurs.

L'appareil de Golgi, qui présente parfois quelques saccules, mais le plus souvent est constitué de petites vésicules denses aux électrons, accompagnées de très grosses vacuoles claires, montre des images particulières (fig. 55) ; des granulations α sont souvent situées à proximité immédiate de l'appareil de Golgi ; dans certaines images, le sac membraneux du grain semble être une différenciation golgienne ; enfin, il arrive qu'à l'intérieur des grosses vacuoles golgiennes claires, se trouvent des grains de petite taille, de densité aux électrons identique à celle de la substance interne des grains α ; ces grains intravacuolaires sont dépourvus de membrane et d'écorce périphérique et flottent dans la vacuole. Ces observations s'insèrent dans le cadre de la théorie qui fait intervenir l'appareil de Golgi dans les phénomènes de sécrétion et donnent à penser que l'enveloppe membraneuse des grains pourrait être d'origine golgienne.

Assez souvent, le cytoplasme contient des corps multivésiculaires qui, en coupe, apparaissent constitués d'une dizaine de petites vésicules entourées d'une membrane.

Souvent, également on trouve des structures membraneuses complexes (fig. 56 et 57) ; il s'agit d'une double membrane fermée sur elle-même qui se courbe en fer à cheval. Les deux feuillets de la double membrane sont séparés par un espace d'environ 400 Å formé d'une phase légèrement plus dense que le cytoplasme. A l'intérieur du fer à cheval, qui peut mesurer jusqu'à 1 μ de diamètre, on trouve généralement plusieurs corpuscules, variables en nombre et en nature : ce sont d'autres anneaux membraneux analogues à l'anneau général (au sein de ces différents anneaux on observe du cytoplasme banal avec grains de Palade) ainsi que des grains plus ou moins atypiques. Dans un cas, on observe une relation de voisinage entre ce complexe organitique et une mitochondrie (fig. 56). La fréquence de ces structures suggère qu'elles peuvent avoir une signification fonctionnelle.

Fig. 51. — Embryon de 4 jours. × 15.840.

Fig. 52. — Embryon de 9 jours. × 9.000

Fig. 53. — Embryon de 18 jours. × 18.480.

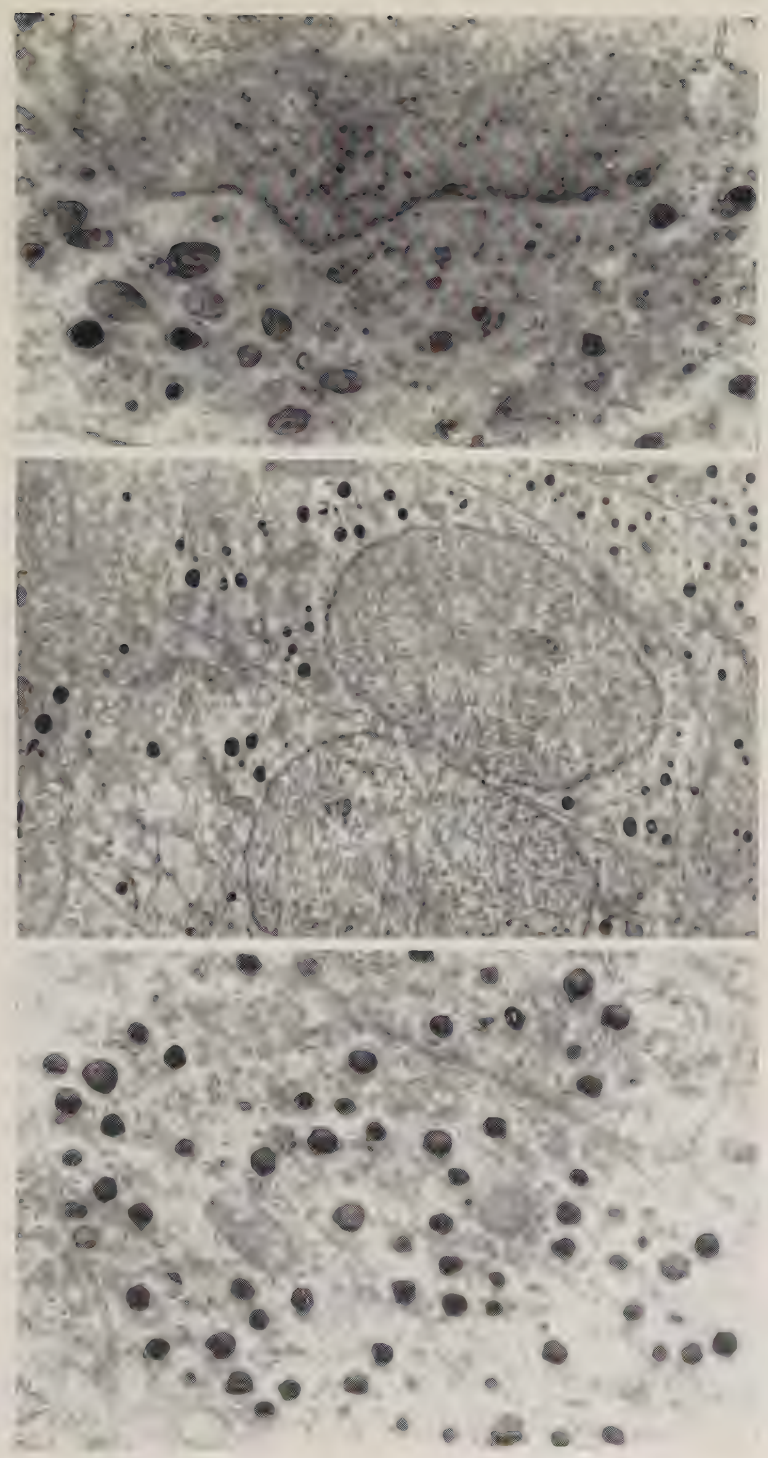


Fig. 51 à 53. — *Comparaison de la morphologie des grains α à différents stades du développement.*

Les centrioles sont fréquents dans la cellule A de 9 jours (fig. 58 à 60). Ils sont toujours associés par deux, en situation très variable l'un par rapport à l'autre. Les dimensions du centriole et de ses éléments constituants sont du même ordre que chez l'embryon de 21 jours. Ces centrioles sont souvent situés au voisinage de la membrane péricellulaire ; dans ce cas un des feuillets de la membrane plasmique est dévié en direction du centriole, s'écartant ainsi de l'autre feuillet (fig. 59).

Dans un cas enfin, nous observons l'émergence d'un cil à partir d'un des deux centrioles (fig. 58). Le centriole proximal (à la base immédiate du cil) est un cylindre de 140 mμ de diamètre sur 215 mμ de long ; l'axe du centriole distal est perpendiculaire à l'axe du centriole proximal ; néanmoins la coupe en est un peu oblique et ne permet pas de compter le nombre des tubules mais montre l'absence de filaments centraux à l'intérieur du cylindre. Le cil lui-même est en continuité directe avec le centriole proximal ; il mesure environ 200 mμ de diamètre et est intéressé par la coupe sur une longueur d'environ 1 μ ; mais on n'observe pas son émergence.

En conclusion, on trouve dans les cellules A de l'embryon de 9 jours un certain nombre de caractères qui correspondent à des cellules jeunes, à la fois en voie de prolifération et en activité élaboratrice :

— nombreux centrioles ; grains de sécrétion α typiques, mais de taille inférieure à la taille des grains définitifs ; grains de sécrétion intra-golgiens.

4° *Les îlots A chez l'embryon de 14 à 18 jours.* — Le lobe splénique est constitué presque uniquement de tissu endocrine A qui forme de grands îlots accolés ; la poussée de tissu exocrine qui les séparera n'a pas encore eu lieu. Ces îlots se caractérisent par la présence de granulations α abondantes, dans un cytoplasme encore relativement peu différencié (fig. 53). L'ergastoplasme est formé de vésicules aplaties et de ribosomes libres.

L'appareil de Golgi est bien développé. Les mitochondries sont étirées et sinueuses, ou encore épaisses. Enfin, il y a encore à ce stade de gros corpuscules lipidiques.

On voit donc que, tout au long de la vie embryonnaire, on trouve une lignée de cellules à granulations α typiques. Ces granulations représentent l'organite le plus constant de la cellule A depuis les stades les plus jeunes que nous avons étudiés jusqu'à l'éclosion. Seule leur abondance et leur

Fig. 54. — Différenciation ergastoplasmique localisée dans une cellule A. × 80.000.

Fig. 55. — Grains en voie de formation au sein de l'appareil de Golgi. × 70.000.

Fig. 56 et 57. — Structures membraneuses complexes, fréquentes dans les cellules A embryonnaires. × 52.500 et × 30.000.

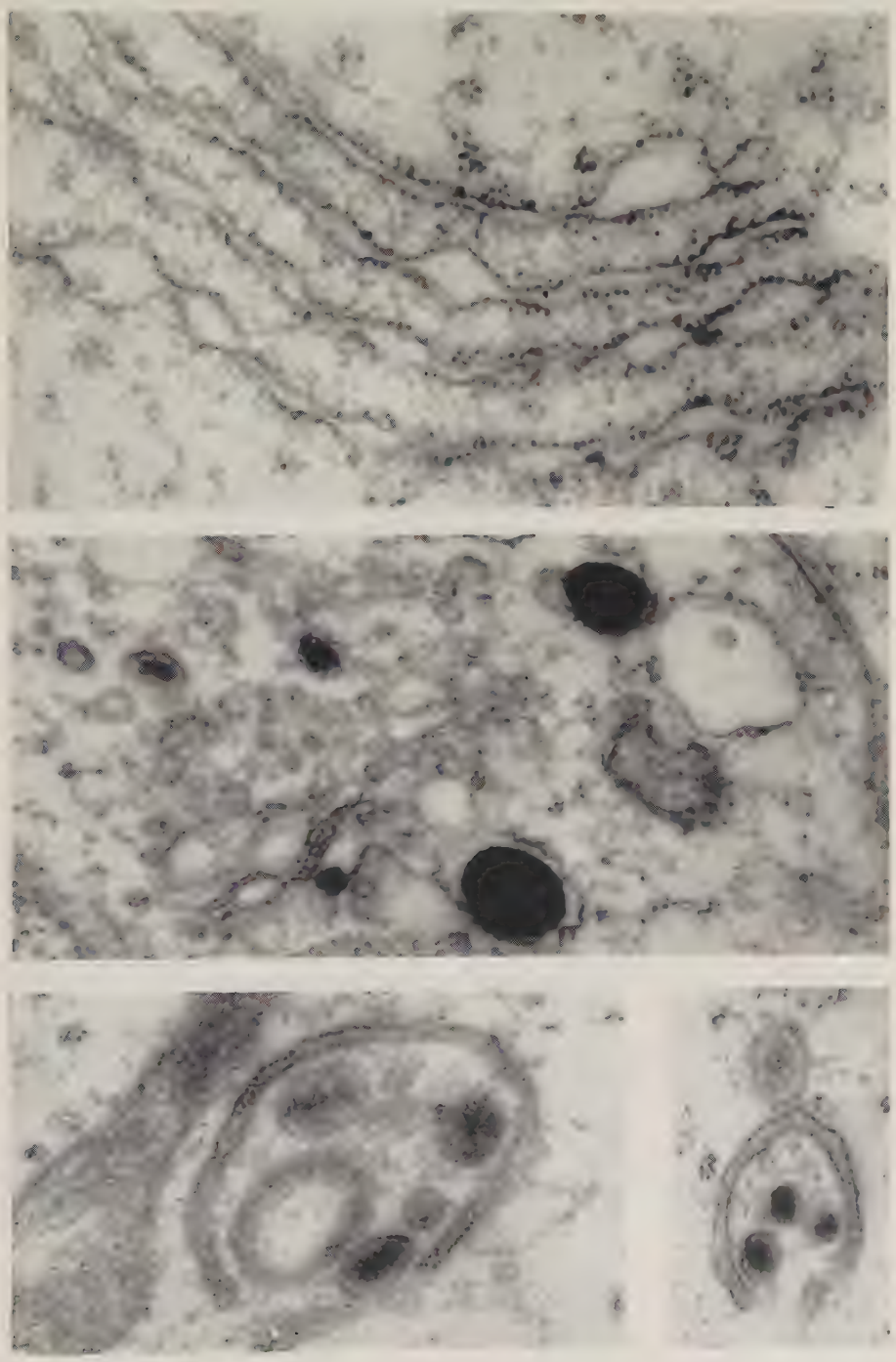


Fig. 54 à 60. — *Détails cytoplasmiques chez l'embryon de 9 jours.*

taille augmentent avec l'âge de l'embryon. Jusqu'à la fin de l'incubation, les cellules A conservent un cytoplasme embryonnaire, très différent de celui qu'on trouve à partir de 21 jours.

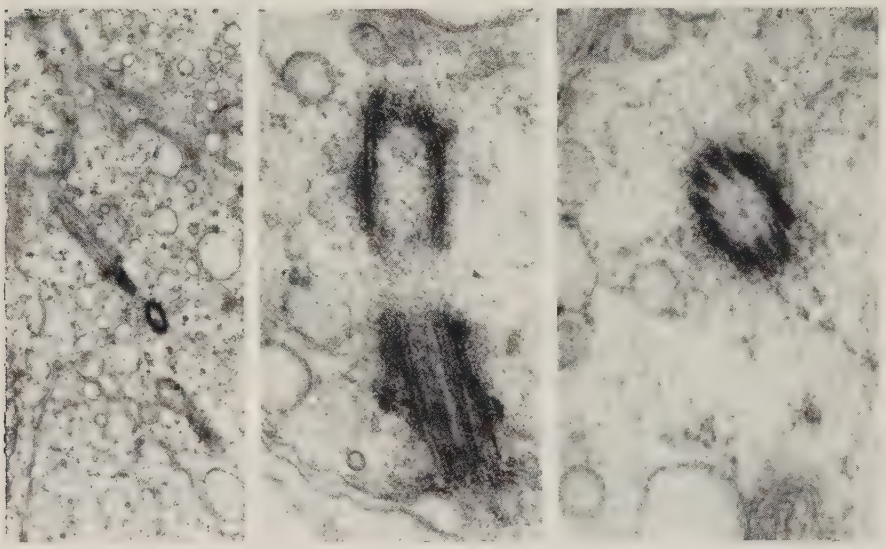


Fig. 58. — Une paire de centrioles dans une cellule A chez l'embryon de 9 jours. Les centrioles sont situés dans des plans perpendiculaires. De l'un d'eux émerge un cil. × 11.250.

Fig. 59. — Détail d'une autre paire de centrioles. On distingue la cavité centrale de l'un, les tubules dans la paroi de l'autre. Il semble y avoir une différenciation de la membrane péricellulaire au contact d'un des centrioles. × 44.800.

Fig. 60. — Coupe transversale légèrement oblique d'un centriole. On peut compter 9 tubules dans la paroi. × 64.575.

III. — La différenciation du tissu endocrine B.

1° *Dès la fin du quatrième jour d'incubation*, nous avons observé des cellules B isolées dans le parenchyme pancréatique indifférencié. Ces cellules sont identifiées grâce à leurs granulations caractéristiques, de forme cristalline. Ce sont des aiguilles fines et petites, dont les figures 61 à 64 présentent différents aspects. Elles sont isolées, ou associées par deux, entourées d'un sac membraneux simple. Ces granulations sont clairsemées dans un cytoplasme indifférencié. Le sac membraneux est parfois ouvert ; la même remarque a été faite à propos des granulations aux stades très jeunes. L'appareil de Golgi est particulièrement développé ; il est formé de saccules nombreux et de petites vésicules. Parfois trois groupes de saccules s'organisent en un ensemble complexe. On trouve souvent des granulations plus ou moins élaborées parmi les vésicules golgiennes (fig. 61 à 64).

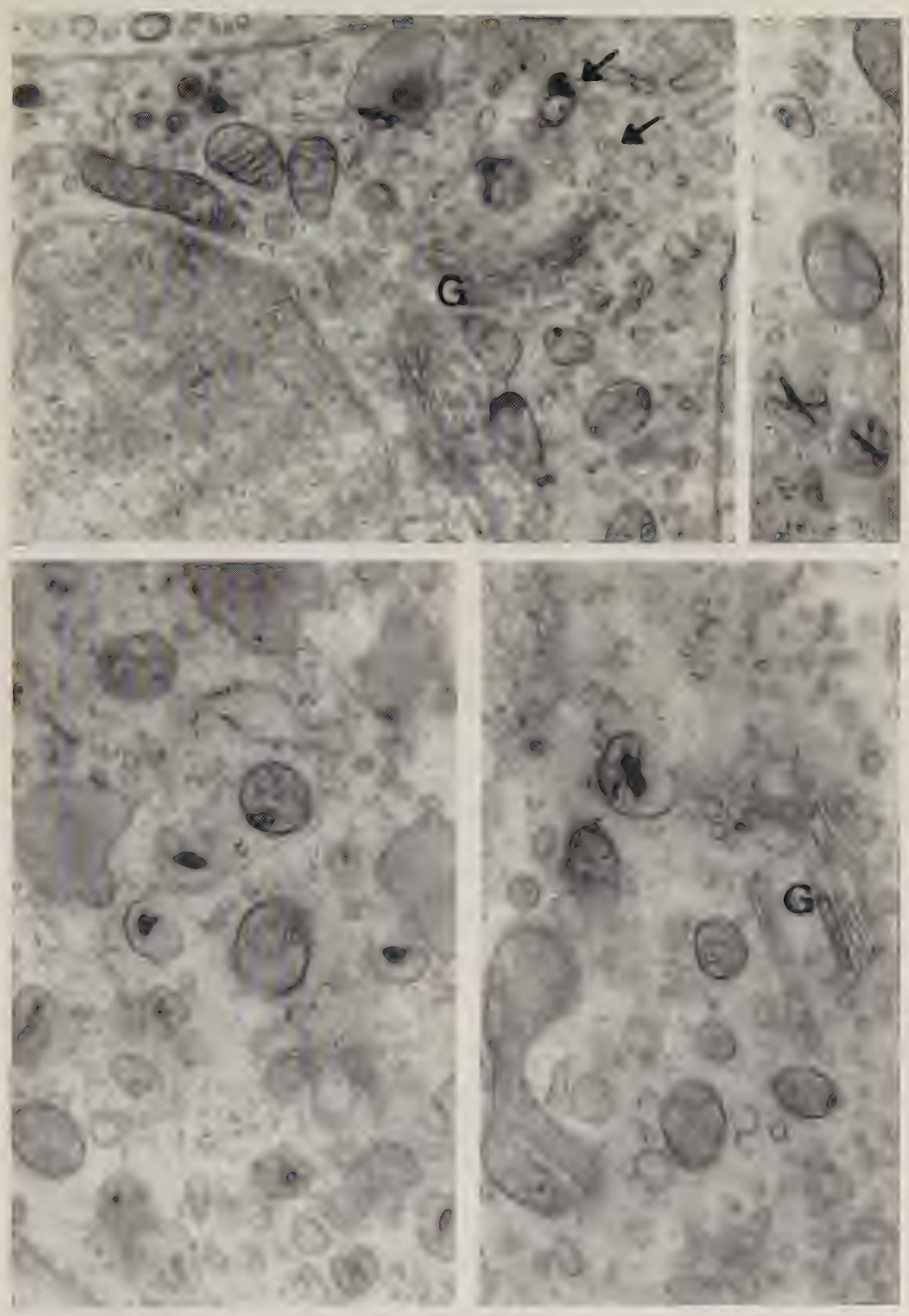


Fig. 61 à 64. — *Grains β chez l'embryon de 4 jours.*

Fig. 61. — Appareil de Golgi très développé (G.). Les flèches indiquent des vésicules à contenu hétérogène fréquentes dans les cellules B jeunes. × 18.200.

Fig. 62, 63 et 64. — Grains β de morphologie typique.
Appareil de Golgi très développé. × 35.530.

Ces aspects sont remarquables, car ils ne sont pas retrouvés aux stades ultérieurs, où l'appareil de Golgi devient au contraire d'une extrême discrétion dans les cellules B.

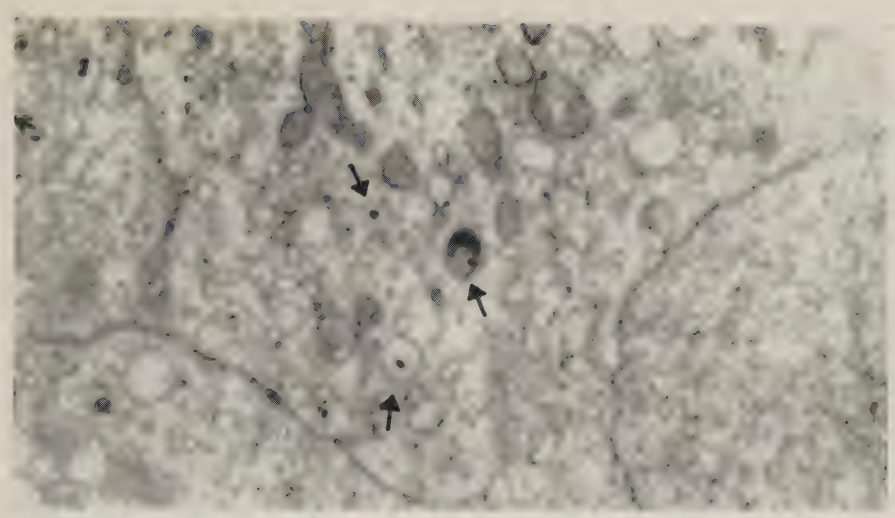
2° C'est dans le lobe splénique de l'*embryon de 7 jours* que nous avons trouvé des cellules B organisées en îlots véritables. Ces îlots voisinent avec les îlots A, et en sont séparés par une ceinture de capillaires et par des cellules mésenchymateuses. Dès ce stade, les organites cytoplasmiques présentent la différenciation spécifique de la cellule B. Les cellules situées au centre de l'îlot sont peu différenciées, avec un cytoplasme clair, des organites petits et peu nombreux ; mais à la périphérie de l'îlot se trouve occasionnellement une cellule dont la différenciation est très avancée ; de telles cellules ont souvent une forme triangulaire, s'enfonçant en coin vers le centre de l'îlot et en contact avec les capillaires périphériques par une large base. Elles possèdent déjà le cytoplasme contrasté dans lequel les grains avec leur sac membraneux large se détachent comme des cavités. Les grains y sont nombreux ; ils atteignent jusqu'à 200 mμ de long ; ce sont en général des bâtonnets épais, rarement des faisceaux d'aiguilles divergentes. Dans les autres cellules, le cytoplasme n'apparaît pas hautement organisé : les grains avec leur sac, peu nombreux, semblent indépendants les uns des autres au lieu de faire partie d'une sorte de réseau. Le cytoplasme est moins contrasté et contient des ribosomes libres peu abondants ; les grains eux-mêmes sont très petits et sont en général punctiformes ou triangulaires ; la prédominance de ces aspects suggère qu'il ne s'agit pas uniquement de coupes transversales à travers des bâtonnets, mais que ces grains ont effectivement dans l'espace la forme de petits tétraèdes. Comme chez l'adulte les grains sont encapsulés dans une large vésicule (diamètre 300 mμ) de forme ronde. Un espace clair de 80 à 100 mμ sépare le grain de la paroi. On observe parfois des stades d'élaboration des grains, comme ceux qui ont été décrits chez le jeune Poussin, c'est-à-dire des vésicules membraneuses, de taille analogue à celle des grains mûrs, qui contiennent un matériau d'autant plus contracté à l'intérieur de la vésicule qu'il est plus dense aux électrons ; mais ces images sont rares et les formes sont moins variées que dans le pancréas différencié. Assez fréquemment, on trouve des enveloppes membraneuses multiples.

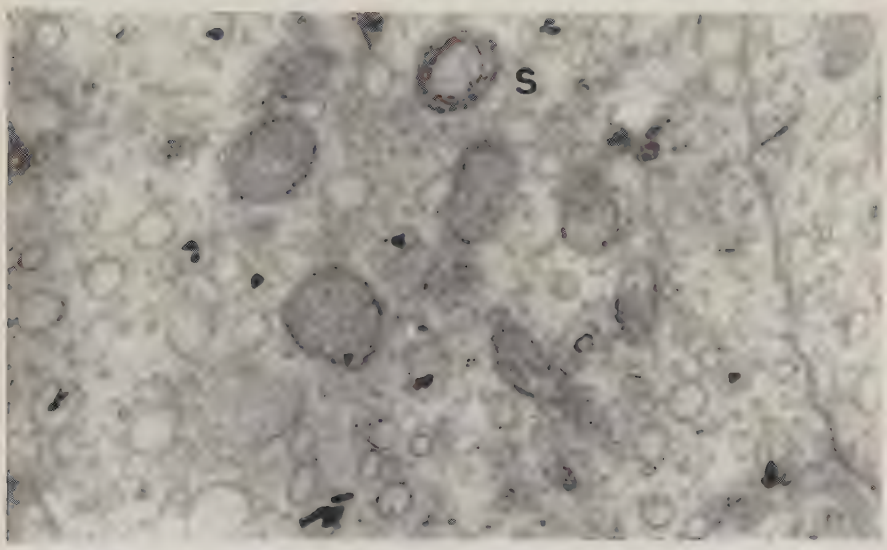
Dès ce stade, l'appareil de Golgi est très discret et semble en régression par rapport à celui qu'on trouve dans la cellule B à 4 jours. Il est composé essentiellement de vésicules. Les mitochondries sont plus mas-

Fig. 65. — Les flèches indiquent 2 grains de très petite taille et une vésicule à contenu dense analogue à celle de la figure 61. × 12.000.

Fig. 66. — S. = sac membraneux à plusieurs tours. × 24.500.

Fig. 67. — La flèche indique un stade d'élaboration du grain β comme on en trouve chez l'embryon de 21 jours. × 22.000.





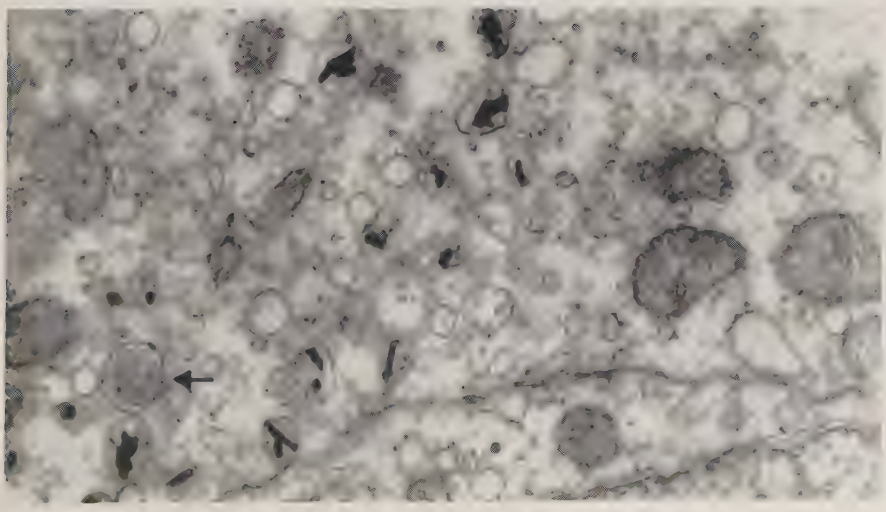


Fig. 65 à 67. — *Grains β de différentes tailles chez l embryon de 9 jours*

sisve qu'à 21 jours et généralement rondes à crêtes transversales et obliques.

3° L'aspect des cellules B chez l'embryon de 9 jours est le même qu'à 7 jours (fig. 65 à 67). Signalons un grain d'une morphologie particulière trouvé chez un embryon de 9 jours : il s'agit d'une vésicule de 400 mμ de diamètre dont le centre est occupé par une membrane enroulée en 2 ou 3 tours tandis que la périphérie contient un matériau amorphe de densité analogue à celle des grains cristallins définitifs (fig. 65).

On peut donc conclure que deux caractères distinguent les cellules B en voie de différenciation des cellules B définitives :

1) La taille exiguë des aiguilles cristallines ;

2) leur distribution clairsemée dans des vésicules indépendantes qui ne forment pas de réseau membranaire.

Par contre, la morphologie des grains est strictement identique à celle des grains dans les cellules B différenciées. Grâce à ces observations, on comprend pourquoi il est difficile de colorer les granulations β par la fuchsine-paraldéhyde ; suivant leur taille les grains se trouvent au-dessous du pouvoir de résolution du microscope optique ou peuvent au contraire conférer à la cellule une très faible coloration cytoplasmique ; s'ils sont encore encore un peu plus gros, la coloration est finement granulaire. Dans ce cas elle apparaît toujours à la périphérie des îlots au contact des capillaires. Les observations ultrastructurales confirment l'abondance des grains au pôle capillaire.

4° L'étude ultrastructurale révèle un stade de différenciation nettement plus évolué à *12 jours*. C'est surtout l'abondance et la taille des grains de sécrétion qui sont frappantes ; nombreux sont ceux qui présentent encore une coupe triangulaire ou punctiforme, mais on en trouve souvent plusieurs dans une même vésicule ; ces vésicules sont serrées. Les grains en faisceaux d'aiguilles commencent à être nombreux. Les cellules insulaires présentent une polarisation marquée : les grains sont particulièrement concentrés au pôle capillaire dans les cellules périphériques de l'îlot ; beaucoup de ces grains périphériques sont enveloppés dans le sac membraneux spiralé, trouvé occasionnellement à 7 ou 9 jours (fig. 68 et 69).

Les mitochondries ont pris la forme allongée, irrégulière et anguleuse qu'elles ont dans la cellule différenciée ; elles sont souvent ramifiées en V ou portent des terminaisons renflées. Leur matrice est très dense, les crêtes longues et régulières, obliques ou plus fréquemment longitudinales. Les grains de Palade en rosettes sont abondants. Enfin, il y a beaucoup

Fig. 68. — Er. = formations ergastoplasmiques localisées. × 13.725.

Fig. 69. — G. = appareil de Golgi discret typique des cellules B différenciées. × 31.500.

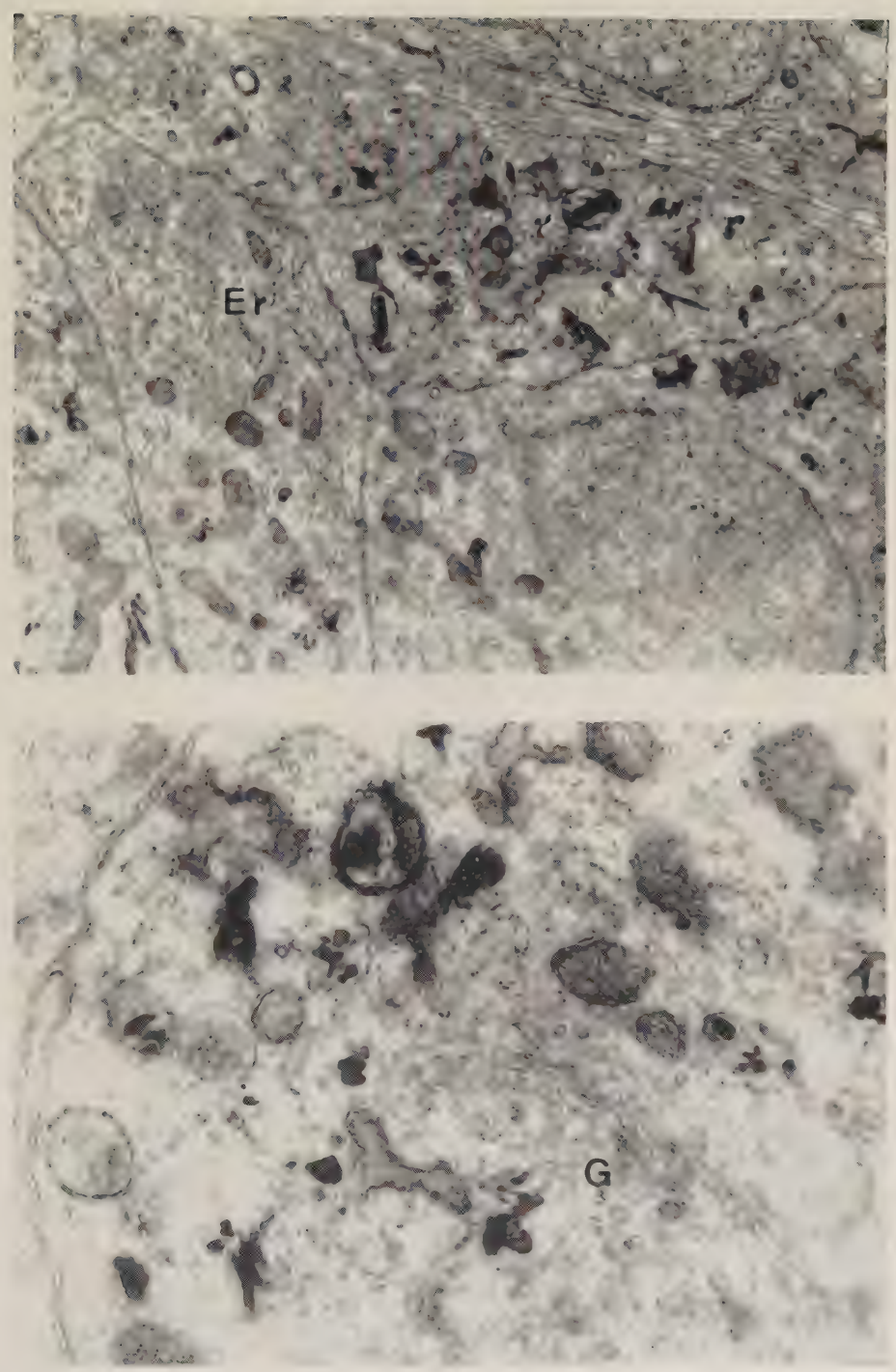


Fig. 68 et 69. — *Multiplication des grains β chez l'embryon de 12 jours, en particulier au pôle capillaire des cellules.*

de corpuscules denses de forme étoilée qui sont sans doute des corpuscules lipidiques.

L'appareil de Golgi est discret (fig. 69).

5° Chez l'embryon de *18 jours* la cellule B a un aspect analogue à celle de 12 jours ; cet aspect peut être qualifié d'embryonnaire, malgré la présence d'abondantes granulations ; en effet, le cytoplasme n'est pas encore envahi par le réseau membranaire qu'on trouve à 21 jours.

Chez un embryon de 16 jours, des formations ergastoplasmiques particulières ont été observées ; elles étaient présentes dans de nombreuses cellules des îlots B. Des formations analogues ont été décrites dans les cellules A embryonnaires. Elles sont localisées à une petite région cytoplasmique, parfois près du noyau, parfois près de la membrane péricellulaire. Ce sont des systèmes de 20 à 30 membranes parallèles qui forment deux à deux des citernes aplaties, portant de nombreux grains de Palade sur leur face cytoplasmique. On trouve parfois à leur voisinage des aiguilles mais sans association morphologique apparente.

Donc comme la cellule endocrine A, la cellule endocrine B élabore des granulations typiques à un stade embryonnaire précoce, mais n'aquiert sa différenciation cytoplasmique définitive qu'à l'éclosion.

DISCUSSION

1° Les caractères ultrastructuraux qui permettent d'identifier les trois types cellulaires fondamentaux du pancréas chez le Poulet peuvent être résumés en tableau :

Type cellulaire	Noyau	Ergastoplasme	Appareil de Golgi	Mitochondries	Grains		
					Taille	Densité	Structure
Exocrine	Gros nucléole	+++ Citernes parallèles	Très développé à grosses vacuoles	Épaisses	$\not\equiv 1\,\mu$	++	Homogène ; membrane fine étroitement appliquée.
Endocrine A		Petites vésicules rugueuses et ribosomes libres	Vésicules et petites vacuoles	Longues sinueuses	0,15 à 0,40 μ	+++	Substance interne dense, écorce claire, enveloppe membraneuse.
Endocrine B		Ribosomes libres	Discret	Longues, souvent anguleuses, crêtes longitudinales	0,4 à 0,6 μ	++	Aiguilles dans un réseau membraneux.

Les granulations des différents types cellulaires constituent le critère d'identification le plus marquant. Aussi ces granulations sont-elles schématisées et rassemblées dans la figure 70. Aux trois sortes de granulations principales ont été adjoints le grain de prozymogène et les divers aspects des granulations des pseudo-éosinophiles.

La cellule pancréatique exocrine, surtout celle des Mammifères, a fait

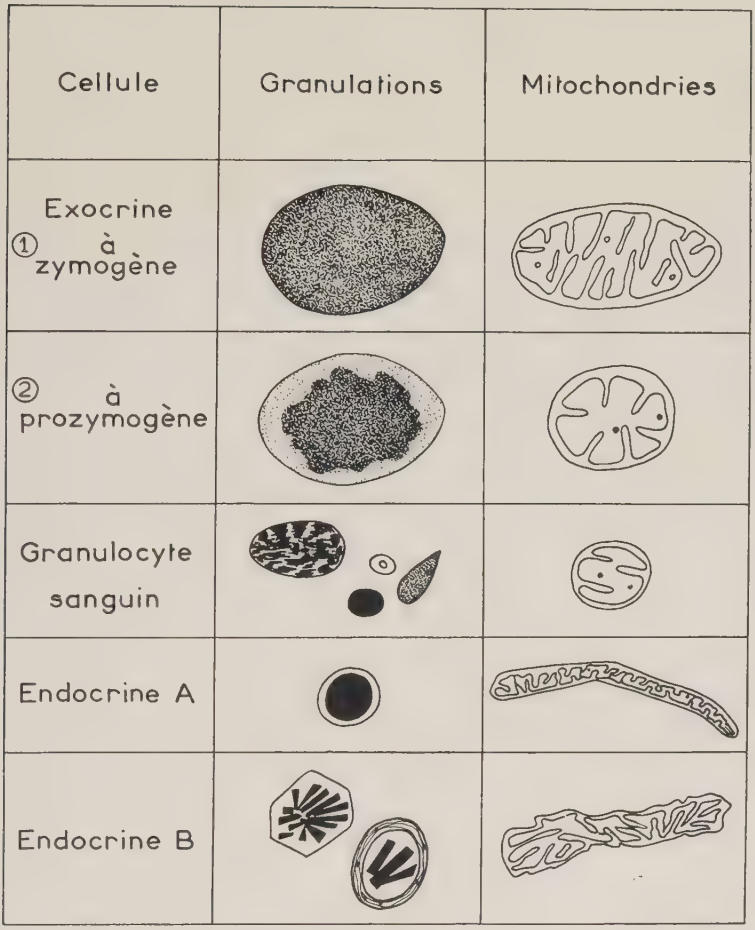


Fig. 70. — Tableau comparatif des types de grains et de mitochondries spécifiques des différentes catégories cellulaires.

l'objet de nombreuses études (cf. en particulier Sjöstrand et Hanzon, 1954 *a* et *b*). Les structures que montre la cellule exocrine différenciée dans le pancréas du Poulet sont très voisines de celles qui sont décrites dans ces travaux.

Les cellules endocrines ont été décrites chez de nombreuses espèces : chez toutes, les cellules A montrent des grains à peu près identiques,

ronds, denses aux électrons, limités par une enveloppe membraneuse distincte (Bencosme et Pease, 1958, chez le Chat et le Cobaye ; Lacy, 1957, 1959, chez le Rat, le Cobaye, le Chien, le Chat, le Lapin, le Poulet ; Münger, 1958, 1962, chez l'embryon de Souris, et chez le Lapin; Winborn, chez le Singe, 1963). Nous retrouvons cet aspect des granulations, qui a déjà été signalé chez le Poulet par Lacy. Par contre les granulations β sont extrêmement polymorphes suivant les espèces (Lacy, 1959, 1961) ; elles sont souvent constituées d'un corpuscule central cristalloïde enveloppé d'un sac large. Les faisceaux d'aiguilles dont sont constituées les granulations β chez le Poulet ont également été décrits par Lacy. Les images décrites ici coïncident avec les siennes et apportent des précisions sur le cytoplasme de la cellule B et en particulier le sac membraneux à plusieurs tours dont s'entoure souvent le grain β.

A l'aide des critères établis pour la cellule différenciée, l'identification des grains chez l'embryon ne pose pas de problèmes en ce qui concerne les grains α, β, ou zymogènes ; au moment de leur apparition ces grains sont de petite taille mais leur morphologie est spécifique. Il y a cependant un type de grain qui paraît particulier à un stade de développement pancréatique : le grain de prozymogène ; les grains de prozymogène ont été décrits par Münger (1958) dans le pancréas de l'embryon de Souris, par Zeigel dans le pancréas de l'embryon de Poulet (1962 *a*), ainsi que par Zeigel et Dalton (1962), par Sjöstrand (1962) dans le pancréas de l'embryon de Rat de 21 jours, par Kallman et Grobstein (1964) dans le pancréas d'embryon de Souris *in vitro*. Les grains de prozymogène décrits par ces auteurs diffèrent des grains Z par une densité plus faible aux électrons ; ils présentent parfois, comme les nôtres, un centre dense et une zone périphérique moins dense (Zeigel, chez le Poulet, et Sjöstrand, chez le Rat) ; mais l'opposition de contraste entre les deux zones est toujours faible. Dans nos observations, il y a au contraire un contraste fort entre un centre très opaque aux électrons et une « écorce » claire. Ce contraste plus violent peut provenir soit d'une différence de technique (coloration par l'acétate d'uranyle au lieu de sels de plomb), ou tenir à une cause physiologique : on serait alors en présence d'un stade particulier de l'élaboration des grains Z. On peut remarquer que, dans toutes ces observations, les grains de prozymogène sont décrits au début de la vie post-embryonnaire, c'est-à-dire au moment de l'entrée en fonction du pancréas exocrine.

2° Chez l'embryon de Poulet, ce stade, situé à l'éclosion, se caractérise également par la présence régulière de cellules mixtes qui contiennent aussi bien des granulations endocrines que des granulations exocrines. Il existe dans la littérature des observations de cellules mixtes. En particulier dans le lobe splénique des Oiseaux, Van Campenhout et Cornelis (1953) ont décrit des images de continuité entre les zones endocrine et exocrine au microscope photonique. Nous confirmons que ces images correspondent à l'échelle ultrastructurale à la coexistence des différents produits de sécrétion du pancréas dans un même cytoplasme. L'existence

de cellules mixtes dans le pancréas des Mammifères a également été observée, dans certaines conditions expérimentales : chez le Rat traité par les sulfamides hypoglycémiants ou la cortisone, on voit des cellules exocrines qui contiennent à la fois des granulations β et des grains Z (Gusek et Kracht, 1959).

3° L'étude ultrastructurale permet de déceler les granulations sécrétoires à des stades très précoces. En ce qui concerne les grains exocrines, nous les trouvons chez l'embryon de 14 jours. Zeigel (1962 *a*) qui a fait une étude du pancréas exocrine de l'embryon de Poulet, en observe à partir de 6 jours d'incubation. Notre intérêt principal ne se centrait pas sur le tissu exocrine et il est possible qu'une recherche plus poussée permettrait de trouver des grains Z avant 14 jours d'incubation. Notons tout de même que le pancréas exocrine conserve encore ses caractères embryonnaires à 18 jours : grains Z rares, ergastoplasme peu développé. Entre 18 et 21 jours se produit une différenciation exocrine accélérée.

Les granulations β ont été trouvées chez l'embryon de 4 jours, dans des cellules isolées ; mais elles sont alors très rares. Entre 7 et 9 jours elles deviennent un peu plus abondantes, mais leur taille et leur nombre sont soumis à des fluctuations individuelles. Ce n'est qu'à partir de 12 jours qu'un changement quantitatif net devient évident ; ces granulations sont alors polarisées en groupes serrés au pôle capillaire des cellules insulaires.

Des granulations α ont été observées dans l'ébauche pancréatique dorsale, chez l'embryon de 3 jours. Toutes les ébauches examinées à ce stade en contenaient. Les granulations α présentent dès lors leur aspect caractéristique et se retrouvent régulièrement à tous les stades ultérieurs sous une forme identique. Il ne saurait donc y avoir de doute, ni sur leur identité, ni sur leur présence à 3 jours d'incubation.

Ces observations n'apportent pas la preuve qu'il s'agit de produits hormonaux définitifs, aussi bien en ce qui concerne les grains α que les grains β. Cependant, il faut souligner que ces granulations restent d'une remarquable constance dans leur aspect pendant la vie embryonnaire et post-embryonnaire. Par ailleurs dans la troisième partie de ce travail, sera démontrée l'activité glycogénolytique du pancréas jeune, ce qui apporte une présomption raisonnable sur la nature des grains α.

4° On peut dégager un certain nombre de caractères spécifiques des cellules embryonnaires, en premier lieu, la prédominance des ribosomes libres et la pauvreté en systèmes membraneux. Ensuite on constate que les premiers grains de sécrétion se forment dans un cytoplasme très peu différencié, quelle que soit la catégorie cellulaire considérée. Seul l'appareil de Golgi des cellules endocrines A et B est très développé aux stades jeunes. Cet aspect est particulièrement frappant en ce qui concerne les cellules B dont l'appareil de Golgi devient extrêmement discret aux stades ultérieurs. Des granulations endocrines, aux stades jeunes, sont souvent présentes parmi les vésicules golgiennes ; souvent même les images suggèrent l'élaboration des grains par l'appareil de Golgi. Des observations analogues sont fréquentes dans le matériel embryonnaire : elles concernent

les granulations β du pancréas du fœtus de Souris (Ferreira, 1957), l'hypophyse du fœtus de Rat (Maillard, 1963).

Un autre aspect particulier des grains α est observé dans l'ébauche dorsale de 3 jours ; le sac membraneux du grain est hérissé de particules attachées. Un aspect semblable est décrit par Williamson, Lacy et Grisham (1961) : il s'agit de grains β en voie de formation dans le pancréas du Rat stimulé par le tolbutamide ; les grains β sont alors enfermés dans des enveloppes membraneuses rugueuses ; les auteurs interprètent les particules attachées à l'enveloppe du grain comme des ribosomes. Nos images au niveau du grain α sont tout à fait identiques. Il est intéressant de remarquer que, très souvent, on observe dans les cellules embryonnaires des images qui ne se trouvent, chez l'adulte, que dans des situations de stimulation particulière où on assiste à une néoformation des grains de sécrétion.

On trouve fréquemment dans le pancréas embryonnaire des centrioles et des dérivés centriolaires tels que les cils. Il est bien connu que les centrioles sont fréquents d'une manière générale dans les cellules à haute activité mitotique et en particulier dans les cellules embryonnaires. Quant aux cils, il est utile de rappeler qu'ils ont été signalés dans certaines situations analogues à celles du pancréas embryonnaire :

1° Dans les cellules embryonnaires : épithélium neural de l'embryon de Poulet (Sotelo et Trujillo-Cenoz, 1958) ; fibroblastes et fibres musculaires de l'intestin de l'embryon de Poulet ou de Rat (Sorokin, 1962) ; cellules β du pancréas embryonnaire de la Souris (Münger, 1958) ; cellules exocrines du pancréas de l'embryon de Poulet de 21 jours (Zeigel, 1962 *b*).

2° Dans certaines cellules endocrines ; cellules adénohypophysaires de la Souris (Barnes, 1961) ; cellules β du pancréas de l'embryon de Souris déjà citées.

Nous avons observé des cils, soit dans les cellules A à différents stades, soit dans les cellules à grains de prozymogène à 21 jours. L'interprétation de ces organites est délicate. Les corpuscules basaux ne possèdent pas de paire centrale de fibrilles ; cette organisation est typique de cils sensoriels plutôt que motiles. Diverses hypothèses ont été émises sur la nature de ces cils : tantôt ils ont été interprétés comme des chemorécepteurs possibles (Münger, à propos des cils des cellules B du fœtus de Souris), tantôt comme des structures embryonnaires transitoires (Sorokin). Il n'est pas possible de trancher la question à l'heure actuelle.

Aux stades jeunes on trouve dans l'ébauche pancréatique des mitochondries à crêtes rares, qui pourraient représenter des formes jeunes. Münger signale également la pauvreté en crêtes des mitochondries dans les cellules indifférenciées du pancréas de l'embryon de Souris ; la formation de crêtes serrées coïncide avec la différenciation des grains de sécrétion exocrines. Nass et Nass (1962) décrivent les mitochondries de l'embryon de Poulet très jeune jusqu'au stade du prolongement cépha-

lique. Ces mitochondries ont très peu de crêtes et montrent des structures fibrillaires longitudinales dans la matrice.

Les corps multivésiculaires semblent également particulièrement abondants dans les cellules embryonnaires. Les gros corpuscules lipidiques constituent encore l'apanage des cellules embryonnaires ; leur nombre et leur taille diminuent avec l'âge (cf. MÜNGER).

En conclusion, le point essentiel qui se dégage de ces observations est la possibilité de déceler, dans des cellules à cytoplasme embryonnaire, des grains de sécrétion qui témoignent d'une différenciation fonctionnelle à des stades précoces.

TROISIÈME PARTIE

INFLUENCE DU PANCRÉAS EMBRYONNAIRE SUR LE GLYCOGÈNE HÉPATIQUE EN PARABIOSE *IN VITRO*

INTRODUCTION

L'étude morphologique du pancréas à l'échelle ultrastructurale permet de déceler chez l'embryon très jeune des grains d'aspect identique à celui des grains endocrines α ou β de l'adulte. Ces observations ne suffisent pas à affirmer la présence de substances à activité hormonale. Par des méthodes de dosage biologique ces substances ont été mises en évidence dans les extraits de pancréas ou le plasma d'embryons de 12 à 13 jours (Grillo, 1961 *a*, *b* et *c* ; Leibson, Zheludkova et Chilingarian, 1961). La présence des grains spécifiques suggère une élaboration hormonale plus précoce, mais très faible ; nous avons cherché à démontrer cette sécrétion par le contact direct entre le pancréas et un organe embryonnaire effecteur, postulant une correspondance physiologique entre les doses hormonales présentes dans le pancréas et les doses nécessaires à la réponse de l'organe réacteur.

Le foie a été choisi comme organe effecteur ; la fonction glycogénique débute chez l'embryon de Poulet vers 6 à 7 jours d'incubation ; dès le début elle est sensible, *in vitro*, à différentes hormones (adrénaline, Gill, 1938 ; insuline, Leibson, 1951 ; Leibson, Zheludkova, Pliseckaya, Stabrowsky, 1961 ; Weston, 1956 ; adrénaline, Leibson, 1960 ; glucagon, Grillo, 1960, 1961 *c* ; Thommes et Firling, 1964).

Foie et pancréas ont été soustraits aux influences humorales de l'organisme embryonnaire et associés en parabiose étroite en culture organotypique par la méthode de Wolff et Haffen. Le premier temps des expériences consistait à observer l'évolution du pancréas explanté et à codifier les conditions d'élaboration du glycogène par le foie *in vitro*. Le deuxième temps devait être consacré à déterminer l'influence d'explants pancréa-

tiques de stades de plus en plus précoces sur des explants de foie prélevés dans des conditions toujours identiques. Ces expériences ont fait l'objet de deux publications préliminaires (Dieterlen-Lièvre, 1960, 1963).

MÉTHODES

Les organes sont explantés et cultivés *in vitro* selon la méthode de culture organotypique de Wolff et Haffen (1952). Les pancréas les plus âgés sont divisés en fragments, tandis que les plus jeunes sont explantés en entier. Les explants hépatiques sont toujours constitués de lamelles minces découpées dans la masse du foie, sauf dans certaines expériences préliminaires mettant en jeu le foie d'embryons très jeunes. Des durées de culture variables allant jusqu'à 7 ou 8 jours ont été utilisées pour l'étude du comportement *in vitro* des organes étudiés ; par suite des observations ainsi faites, la durée de la culture a été fixée à trois jours dans les protocoles expérimentaux ; le foie qui entre dans la constitution des parabioses est toujours prélevé sur des embryons de 6 jours. Au contraire, le pancréas associé est d'âge variable. Pour la réalisation des parabioses les fragments des deux organes sont placés sur le milieu en contact les uns avec les autres ; il s'agit, selon les cas, de mélanges en mosaïque de petits fragments ou, le plus souvent d'un grand fragment pancréatique entouré de petits fragments de foie. Très rapidement les tissus hétérogènes se soudent intimement en formant un seul explant.

L'étude du glycogène hépatique après culture est faite sur des coupes colorées par la méthode de Hotchkiss-McManus après fixation des pièces au liquide de Gendre. Les coupes sont montées par groupes de 5 en deux séries alternées ; la première série est consacrée à la mise en évidence du glycogène ; la deuxième est soumise au test de digestion par l'amylase. Les quantités de glycogène formées sont estimées visuellement. D'après cette estimation les explants sont classés en cinq catégories suivant l'abondance et la distribution des gouttelettes de glycogène. L'apparence des explants dans chacune de ces catégories est représentée par les figures 71 à 75. Voici groupés en un tableau les critères qui définissent ces catégories et la façon dont elles seront représentées schématiquement dans l'expression graphique des résultats :

0 = pas de glycogène ou des traces (fig. 71).

\+ = glycogène en gouttelettes fines, isolées les unes des autres, souvent localisées irrégulièrement dans certaines zones de l'explant (fig. 72).

++ = glycogène en gouttelettes serrées, mais seulement dans certaines zones de l'explant (fig. 73).

+++ = glycogène en gouttelettes serrées dans tout l'explant (fig. 74).

++++ = grosses gouttes confluentes formant des amas (fig. 75) (cette configuration n'est réalisée que dans les expériences sur des milieux contenant des hormones et n'est pas schématisée).

Cette méthode n'est pas quantitative mais offre l'avantage d'une bonne sensibilité à l'échelle embryonnaire où les quantités d'hormones à déceler sont extrêmement faibles.

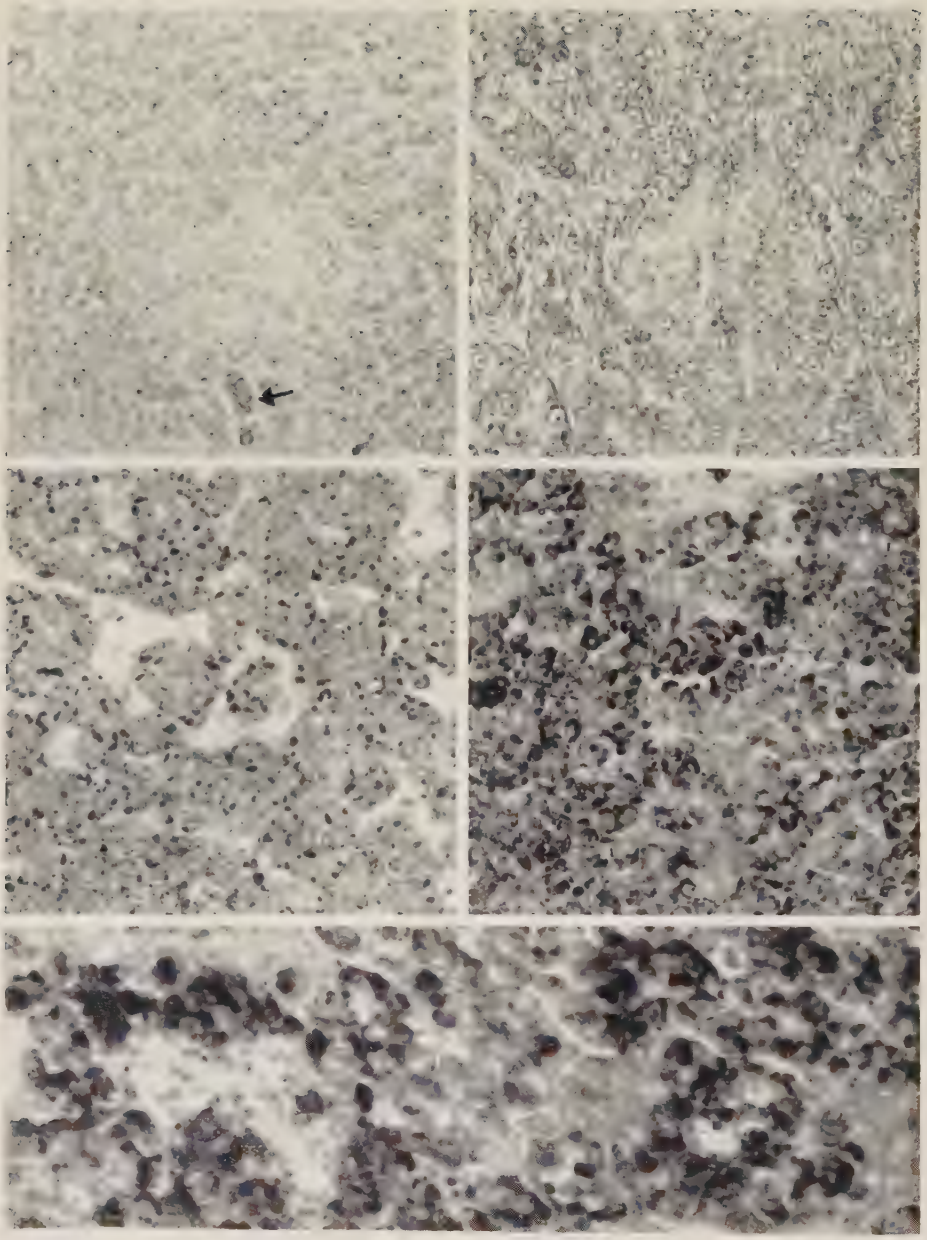


Fig. 71 à 75. — *Échelle comparative des différentes quantités de glycogène élaborées par les explants hépatiques en culture (Gendre, APS, hématoxyline de Groat.* × 420*).*

Fig. 71. — Glycogène = 0 (présence d'un macrophage — flèche).

Fig. 72. — Glycogène = +.

Fig. 73. — Glycogène = ++.

Fig. 74. — Glycogène = +++.

Fig. 75. — Glycogène = ++++ (en présence d'hormones). × 546.

CHAPITRE PREMIER

CULTURE DU PANCRÉAS *IN VITRO*

HISTORIQUE

Un certain nombre d'études ont été faites entre 1925 et 1935 sur le comportement du pancréas en culture de cellules ; elles montrent une dédifférenciation épithéliale accompagnée de la prolifération des fibroblastes.

C'est à partir de 1954 que le maintien ou la différenciation de la structure pancréatique complexe sont obtenus *in vitro* en culture organotypique. Chez les Mammifères, Chen (1954) obtient la différenciation de cellules exocrines à grains de zymogène dans l'ébauche pancréatique de l'embryon de Rat de 13 jours, cultivée sur « lens paper » ; au moment de l'explantation cette ébauche est formée d'un réseau de tubules à épithélium unistratifié ; des îlots apparaissent également en culture mais leurs cellules ne contiennent pas de granulations spécifiques (méthode de Bensley). Golosow et Grobstein (1962) montrent que cette différenciation acineuse de l'épithélium dépend de la présence du mésenchyme de l'ébauche ; du mésenchyme hétérogène (poumon, foie, estomac, glande salivaire, mésenchyme général) est également capable d'induire la formation d'acini dans l'épithélium pancréatique isolé ; un temps de contact minimum entre les deux tissus est nécessaire à la détermination de l'épithélium par le mésenchyme (Grobstein, 1964). D'autres études sur le maintien en culture organotypique de l'ébauche pancréatique d'embryons de Souris ou de Rat ont été faites ces dernières années par Zagury (1961), Van Strijthem (1959-1960), Fautrez, Vakaet et Van Strijthem (1960), Wells et Borghese (1961, 1963), Schweisthal, Ceas et Wells (1963 *a* et *b*), Murrell et Lazarow (1963). Les deux derniers groupes d'auteurs ont obtenu la différenciation en culture de cellules B à granulations colorées par la fuchsine-paraldéhyde.

Chez l'embryon de Poulet, on n'a pu jusqu'à présent obtenir la formation de grains de zymogène en culture ; on ne peut pas affirmer non plus que des îlots se différencient en culture, puisque les îlots se forment *in vivo* extrêmement tôt et sont présents au moment de l'explantation. Black et Comolli (1954) ont cultivé le pancréas de l'embryon de 6 à 14 jours par la technique de Wolff et Haffen ; ils observent la formation de cavités acineuses et la présence d'abondants îlots dans la branche splénique du pancréas. Les granulations spécifiques des cellules insulaires, délicates à mettre en évidence *in vivo*, comme on l'a vu, sont encore plus difficiles à obtenir *in vitro*. Ghiani et Orsi (1962) ont cependant obtenu la persistance des granulations β pendant 2 à 4 jours de culture dans des ébauches de 12 à 14 jours ; quant aux granulations α, on les trouve dans les ébauches cultivées, lorsqu'elles sont prélevées sur des embryons de 5 jours ou plus. Nous avons montré (Dieterlen-Lièvre, 1960) la possibilité de cultiver du tissu insulaire A presque pur. Ce résultat a été confirmé par Drukker (1961, 1964).

L'évolution en culture des différentes lignées cellulaires présentes dans l'ébauche du pancréas, explantée à différents stades, sera étudiée dans ce chapitre. Les ébauches cultivées ont été prélevées entre les stades de 14 jours et de 3 jours d'incubation. Certaines cultures ont été prolongées pendant 7 jours, mais la plupart sont fixées après 3 jours *in vitro* ; on verra par la suite que ce délai est favorable à un certain type d'observations et par ailleurs, suffit à l'établissement des caractères propres à la culture. La structure des explants est déterminée par la région du pancréas dans laquelle ils sont prélevés : provenant de la branche splénique ils sont formés d'îlots juxtaposés, accompagnés de tubules peu nombreux ; prélevés dans les branches ventrales ils sont composés de tubules ; de la paroi de ceux-ci se différencient parfois de petits îlots B.

I. — Évolution de la différenciation insulaire.

Dans nos conditions de culture, c'est-à-dire sur un milieu anhormonal, les îlots évoluent de manière limitée. Le tissu insulaire conserve son architecture typique : cellules disposées en formations rondes, dépourvues de lumière centrale ; les noyaux présentent de petites mottes de chromatine et un nucléole discret ; le cytoplasme manifeste une certaine affinité pour le réactif de Schiff.

Dans les explants prélevés sur des embryons de plus de 8 jours, les

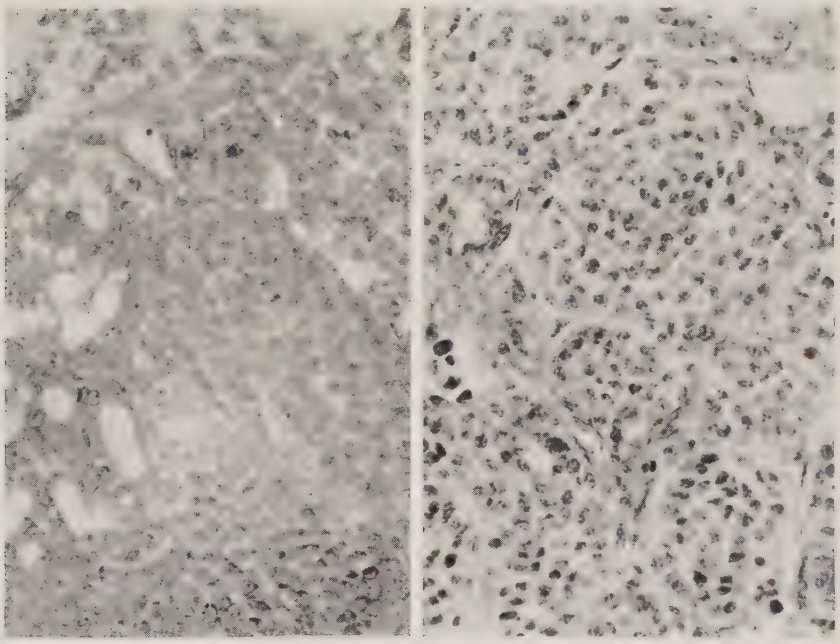


Fig. 76 et 77. — *Évolution insulaire après 3 jours de culture (APS).*

Fig. 76. — Ébauche prélevée sur un embryon de 6 jours. Quelques gouttes de glycogène dans l'îlot. × 350.

Fig. 77. — Lobe splénique prélevé sur un embryon de 14 jours. × 460.

formations insulaires s'encapsulent de fibroblastes et d'abondantes fibres collagènes (fig. 77) ; dans les explants plus jeunes, ces formations sont moins fortement individualisées, le collagène apparaît sous forme de petites masses amorphes aux carrefours intercellulaires (fig. 76). Les explants de 5 à 7 jours sont constitués presque exclusivement de tissu insulaire. Fréquemment les cellules insulaires contiennent de fines gouttes de glycogène, ce qui est probablement un signe de souffrance cellulaire.

Les ébauches prélevées à 3 ou 4 jours sont formées de tissu épithélial inorganisé avec une ou deux formations nettement insulaires. On trouve des mitoses dans le tissu insulaire, beaucoup moins fréquentes toutefois que dans l'épithélium des tubules. Aucun critère ne permet d'affirmer que de nouveaux îlots se forment en culture, puisque des îlots sont toujours présents au moment de l'explantation, quel que soit le stade d'incubation où on l'effectue.

L'étude des granulations spécifiques des cellules insulaires est délicate. On trouve des granulations α colorables par l'azan en quantités faibles ; cette observation est plus nette lorsque l'ébauche explantée est âgée d'au moins 8 jours. Le microscope électronique confirme la présence de granulations α en culture. Par contre, en culture sur le milieu standard, il n'y a jamais de granulations β visibles à l'échelle optique ; une recherche ultrastructurale très soigneuse permet de trouver exceptionnellement des aiguilles d'aspect typique, mais ces aiguilles sont très rares et toujours très petites. Les conditions de culture standard ne sont donc pas favorables soit à la différenciation, soit au stockage de l'insuline sous forme de grains de sécrétion figurés. Des granulations β colorables par le fuchsine-paraldéhyde apparaissent dans une proportion non négligeable des explants, lorsque ceux-ci sont cultivés sur un milieu enrichi en glucose : dans deux explants sur 12 après 5 jours de culture sur un milieu glucosé à 10 0/00 (le milieu standard contient 1 0/00 de glucose); dans 5 explants sur 7 après 24 heures de culture et 1 explant sur 3 après 48 heures de culture sur un milieu à 20 0/00 ; mais le glucose à 20 0/00 exerce un effet toxique sur les explants et il n'est pas possible de poursuivre la culture plus longtemps.

II. — Évolution des tubules primitifs et relations épithélium-mésenchyme.

Quelques tubules primitifs voisinent dans les explants de segment splénique avec les îlots ; dans les fragments des branches ventrales, les tubules constituent la totalité de l'ébauche ; ils sont accompagnés de rares et petits îlots B.

Les fragments de la tête du pancréas prélevés sur des embryons de 9 à 14 jours évoluent de la manière suivante : le mésenchyme lâche présent au moment de l'explantation devient compact ; les tubules s'encapsulent dans une enveloppe de fibroblastes et de fibres collagènes ; la lumière est large et la paroi épithéliale irrégulière, de contour déchiqueté. Entre les tubules ou appendus à leur paroi, on trouve quelques petits îlots B. La différenciation acineuse ne se fait pas dans les conditions de la culture.

Avant 8 jours, c'est-à-dire avant l'interpénétration étroite du mésenchyme et de l'épithélium, l'évolution des explants est très différente suivant qu'on prélève l'ébauche entière ou seulement l'ébauche épithéliale. En effet, les tubules épithéliaux encore peu ramifiés apparaissent sous forme d'anneaux blancs opaques qu'on peut séparer mécaniquement de

leur gaine transparente de mésenchyme ; dans ces conditions la quantité de cellules mésenchymateuses prélevées est infime.

1° *L'ébauche prélevée dans sa totalité* conserve son architecture sans se différencier activement ; les tubules se ramifient dans du mésenchyme lâche ; la paroi des tubules est formée de cellules épithéliales hautes, très saines, dont le noyau présente un très gros nucléole ; les culs-de-sac terminaux sont pleins (fig. 78).

2° *L'ébauche débarrassée de la majeure partie de son mésenchyme* évolue selon un processus qui a lieu *in vivo* de manière très limitée, mais qui s'intensifie et se généralise dans ces conditions expérimentales. Il s'agit d'un processus de dégénérescence cytoplasmique qui creuse des cavités dans l'épithélium ; ce processus semble être une propriété spécifique de l'épithélium des bourgeons pancréatiques : *in vivo* il se manifeste dans la branche splénique, au pourtour des îlots ; dans les branches ventrales, il creuse une lumière centrale dans les cordons pleins qui envahissent le mésenchyme et qui se transforment ainsi en tubules creux. Ce phénomène consiste en une disparition progressive du cytoplasme : les noyaux restent d'abord sains, puis disparaissent à leur tour. Il semble toucher de préférence les cellules tubulaires primitives marquées par leur gros nucléole, mais affecte également l'intérieur même des îlots. Dans les cultures d'épithélium pauvre en mésenchyme, ce processus prend une extension considérable : l'épithélium se creuse de cavités à contours déchiquetés à l'intérieur desquelles flottent des fragments de cytoplasme ; fréquemment des noyaux nus sont suspendus dans la lumière, reliés à la paroi épithéliale par un pont de cytoplasme mince. Après trois jours de culture, le tissu a l'aspect d'une écumoire au milieu de laquelle persistent des îlots sains bien individualisés (fig. 79).

Le processus se déroule de manière analogue dans des bourgeons épithéliaux de 5 jours dissociés de leur mésenchyme par la trypsine.

Des observations complémentaires sont fournies par la culture sur les milieux riches en glucose : lorsque la concentration du glucose atteint 15 à 20 0/00 le mésenchyme manifeste une sensibilité différentielle ; après 24 heures de culture, il est complètement nécrosé, tandis que l'épithélium reste sain. Or, cet épithélium, accompagné de mésenchyme nécrosé, ne manifeste aucune tendance à la dégénérescence lacunaire, mais forme des tubules réguliers. Il semble donc que le mésenchyme, même nécrosé, apporte une substance nécessaire à la différenciation normale de l'épithélium (fig. 80).

En conclusion de ces observations, on peut formuler l'hypothèse suivante : le creusement de cavités par dégénérescence cellulaire est une tendance normale des cellules épithéliales des bourgeons pancréatiques embryonnaires du Poulet ; cette tendance aboutit, lorsque les proportions entre cellules épithéliales et cellules mésenchymateuses sont respectées, à la formation de tubules réguliers à partir de cordons cellulaires pleins.

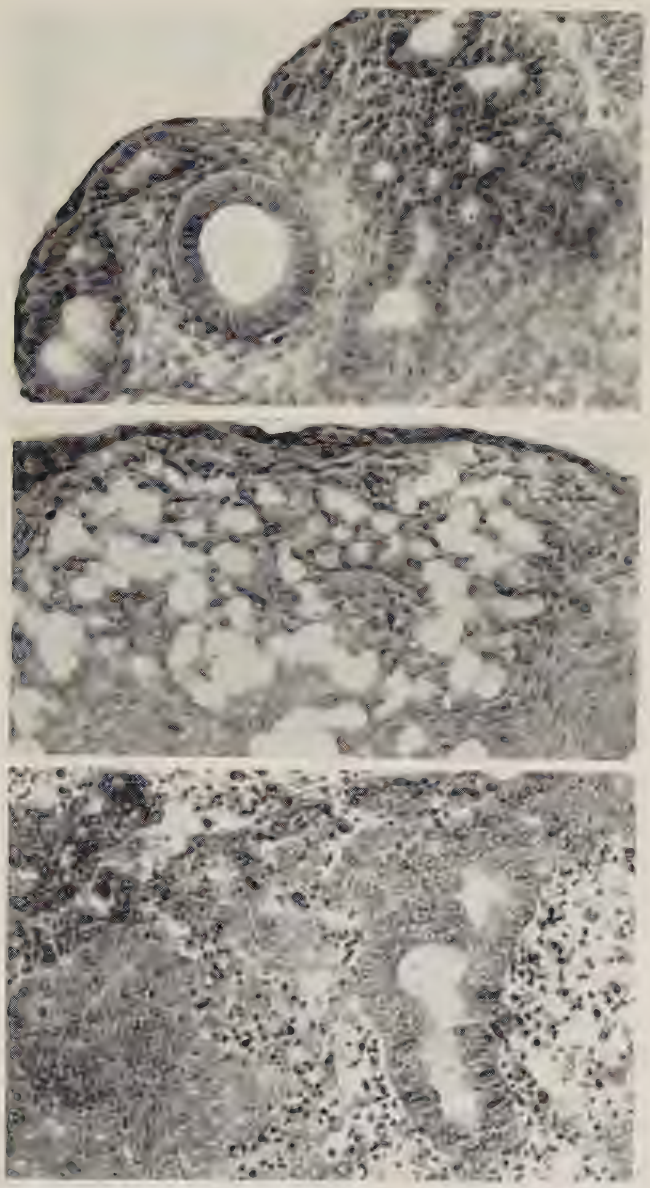


Fig. 78 à 80. — *Evolution en culture des tubules primitifs d'ébauches prélevées à 9 jours. Fuchsine-paraldéhyde hématoxyline de Groat picro-indigo-carmin.*

Fig. 78. — Ébauche prélevée en totalité. ×350.

Fig. 79. — Épithélium dépouillé de la majeure partie du mésenchyme : formation de lacunes. × 350.

Fig. 80. — Ébauche totale cultivée sur un milieu glucosé à 15 0/00. L'épithélium est sain et non lacunaire malgré la nécrose du mésenchyme. × 460.

Par contre, si le contrôle exercé par les cellules mésenchymateuses disparaît, le processus de creusement de l'épithélium aboutit à une dégénérescence anarchique.

CHAPITRE II

LE GLYCOGÈNE HÉPATIQUE EN CULTURE ORGANOTYPIQUE

Le foie de l'embryon de Poulet commence à élaborer du glycogène *in vivo* à 6-7 jours d'incubation (Guelin-Schedrina, 1934 ; Dalton, 1937 ; Gill, 1938 ; Lee, 1951 ; Sames et Leathem, 1952 ; O'Connor, 1953 ; Rimniceanu-Miclea et Lungulescu-Dragan, 1955). Différents auteurs ont montré que les cellules épithéliales du foie, prélevé sur un embryon après le début de la fonction glycogénique et explanté en culture histiotypique, continuent à accumuler du glycogène *in vitro* : Doljanski, 1931 (foie de 8 jours) ; Nordmann, 1929 (9-12 jours) ; Gill, 1938 (6-16 jours) ; Verne et Hébert, 1963 *a* (8-16 jours).

Il en est de même en culture organotypique ; on a même pu montrer que le foie élabore du glycogène *in vitro* à un stade antérieur au stade normal d'apparition du glycogène *in vivo* (Lövlie, 1959, Dieterlen-Lièvre, 1960 sur le Poulet ; Beaumont, 1956-1960 sur les Amphibiens).

Observations. — Le foie, chez l'embryon de Poulet, est formé de cordons épithéliaux séparés par de larges sinusoïdes. Au cours du développement normal, l'apparition des premières gouttelettes de glycogène se situe entre 6 et 7 jours d'incubation ; il n'est pas possible d'en préciser le stade exact, qui varie avec les individus. Entre 5 et 6 jours s'ébauche le sillon médian qui divise l'organe impair originel en deux lobes, le lobe droit étant toujours plus important que le lobe gauche.

L'élaboration du glycogène hépatique *in vitro* a été étudiée dans des explants prélevés sur des embryons de 4 jours à 10 jours. Les foies de 4 jours sont explantés en entier ; les foies de 5 jours ou plus donnent un certain nombre d'explants, chacun d'entre eux est constitué par plusieurs minces lamelles taillées dans l'organe et associées entre elles : au bout de 24 heures elles se soudent, constituant un explant homogène dans lequel il est impossible de distinguer les lignes de fusion ; cette technique permet d'obtenir les faibles épaisseurs cellulaires nécessaires à une nutrition et une respiration correctes des explants. Les lamelles sont prélevées indifféremment dans le lobe droit ou le lobe gauche de l'organe, qui ne paraissent pas, *in vivo*, différents l'un de l'autre en ce qui concerne l'apparition du glycogène. Les explants sont cultivés pendant des délais variables allant de 24 heures à 7 jours sans lavage ni transplantation.

Un certain nombre de données relatives à l'évolution du foie cultivé se dégage de ces expériences :

1° Les cordons hépatiques peuvent conserver ou non leur architecture typique *in vitro*. Dans le premier cas, les explants ont une structure lâche, de larges espaces vides séparent les cordons épithéliaux qui sont bordés de cellules endothéliales comme *in vivo* ; les espaces intercordonaux contiennent souvent des macrophages et parfois des cellules nécrosées. Dans le deuxième cas, qui est le plus fréquent, les cellules hépatiques, se regroupent en un parenchyme homogène et compact.

2° Il y a toujours des macrophages dans les cultures de foie. Ce sont de grosses cellules libres, dont le noyau est repoussé latéralement par des inclusions serrées, réfringentes, irrégulières, colorables en rose vif par l'APS, en violet par la fuchsine-paraldéhyde ; ces inclusions restent colorables par l'APS après digestion amylasique et ne peuvent donc être confondues avec les gouttes de glycogène des cellules hépatiques proprement dites. Le nombre des macrophages augmente avec la durée de la culture. Ils sont situés entre les cellules épithéliales ou dans les espaces entre les cordons de cellules hépatiques.

3° Quel que soit l'âge des explants, du glycogène y apparaît après 24 heures de culture ; du foie prélevé sur un embryon de 4 jours, par exemple et cultivé 24 heures, donc âgé au total de 5 jours, contient des gouttelettes de glycogène. Il semble donc que la cellule hépatique très jeune possède l'équipement enzymatique nécessaire à la fonction glycogénique et que d'autres facteurs interviennent *in vivo* pour empêcher l'accumulation de glycogène avant le septième jour. Les explants prélevés sur des embryons plus âgés commencent également à élaborer du glycogène dès le début de la culture.

4° La présence de glycogène *in vitro*, quel que soit l'âge des explants, suit une évolution assez constante : la quantité de glycogène accumulée croît pendant les 3 à 4 premiers jours ; puis, si on poursuit la culture plus longtemps, le glycogène disparaît progressivement des explants. Du foie de 4 jours cultivé pendant 3 jours est beaucoup plus riche en glycogène que du foie normal de 7 jours (fig. 81 et 82). Cependant, il ne s'agit que d'un schéma général : on note d'importantes variations individuelles d'un foie à l'autre, ainsi que des fluctuations d'une série expérimentale à une autre, le taux d'élaboration du glycogène pouvant varier dans de larges limites.

5° L'association *in vitro* du foie à d'autres organes embryonnaires de nature variée favorise l'élaboration de glycogène : les quantités de glycogène présentes dans les explants de foie en parabiose sont plus importantes et persistent plus longtemps que dans les explants de foie témoins provenant des mêmes embryons, cultivés seuls. Les organes qui ont été associés au foie sont les suivants : thyroïde, poumon, intestin, mésonéphros. La variété de ces organes suggère qu'il ne s'agit pas d'un effet spécifique, mais d'un effet trophique. De telles influences ont pu être montrées pour d'autres organes en culture (Wolff, Haffen et Dieterlen, 1960).

6° Le foie cultivé est également capable de réagir par une accumulation accrue de glycogène à la présence de certaines hormones dans le milieu :

l'insuline (1), à la dose de 0,05 U pour 0,5 cm³ de milieu, un extrait corticosurrénal total (2), à la dose de 0,08 U pour 0,5 cm³ de milieu provoquent une surcharge durable en glycogène dans les explants (fig. 75).

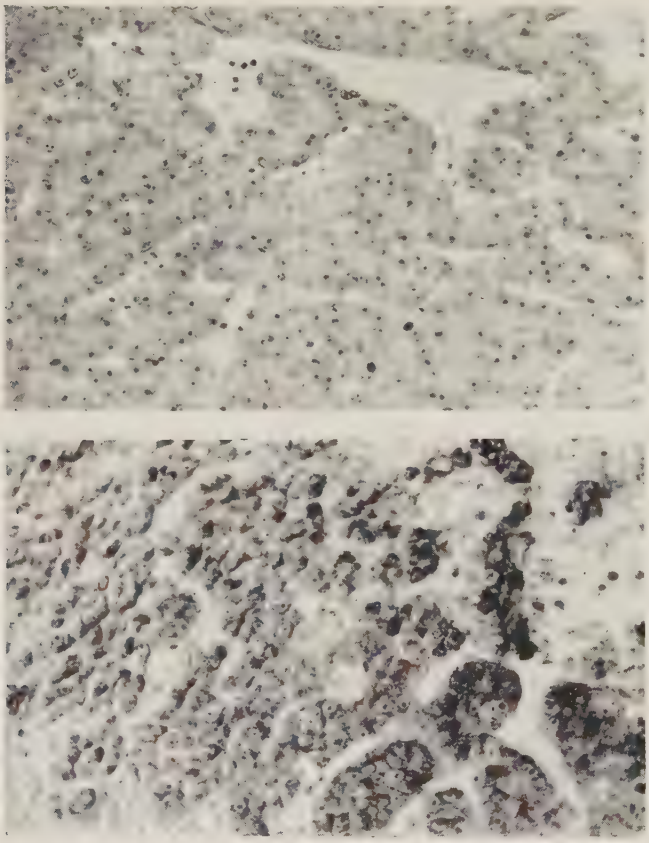


Fig. 81. — Foie normal de 7 jours (Gendre, APS. × 350).

Fig. 82. — Foie de 4 jours cultivé 3 jours. Glycogène abondant. APS. × 350.

De ces différentes observations se dégage la difficulté de codifier l'évolution de la fonction glycogénique en culture. On trouve tout de même certaines constantes qui permettront d'utiliser le foie comme organe effecteur dans des expériences de parabiose :

— le taux d'accumulation du glycogène est généralement homogène dans une série expérimentale. Dans la tabulation des résultats, nous avons éliminé les séries où la formation de glycogène dans les explants témoins était trop faible ;

(1) Insuline des Laboratoires de l'Endopancrine.
(2) Cortine naturelle des Laboratoires Laroche-Navarron.

— les différents explants provenant d'un même foie élaborent en culture des quantités de glycogène analogues. On peut donc comparer explants témoins et explants associés.

En conclusion de ces expériences préliminaires nous avons adopté, dans les séries expérimentales, l'explantation du foie de 6 jours et sa culture pendant 3 jours. Ce protocole permet l'obtention des quantités maximales de glycogène dans nos conditions de culture organotypique. En outre, la taille du foie de l'embryon de 6 jours est telle qu'on peut préparer 6 explants (ou plus) à partir d'un seul organe.

CHAPITRE III

ASSOCIATIONS PANCRÉAS-FOIE *IN VITRO*

Il s'agit, dans ces parabioses, de mettre en évidence l'influence que le pancréas est susceptible d'exercer sur l'élaboration du glycogène hépatique, puis de déterminer à partir de quel stade du développement pancréatique cette influence se manifeste. Nous adoptons en conséquence des conditions standard pour la culture du foie : âge et durée de culture fixes ; ce sont les conditions qui ont été codifiées au chapitre précédent à la suite des résultats des cultures de foie seul. Au contraire, l'âge de l'élément pancréatique des parabioses varie dans les expériences, des stades évolués aux stades jeunes.

Les pancréas de 14 jours à 8 jours donnent des fragments de deux types différents (fig. 20) :

1° La branche splénique ou des fragments de la branche splénique (queue du pancréas).

2° Des fragments de branches ventrales (tête du pancréas).

Les pancréas plus jeunes sont explantés en entier.

Suivant l'âge du pancréas le schéma des expériences est alors l'un des deux suivants :

— *1 foie de 6 jours* → 1 explant + queue du pancréas (14 à 8 jours) ;
→ 1 explant + tête du pancréas du même âge ;
→ 1 explant seul.

— *1 foie de 6 jours* → 1 explant + pancréas entier (moins de 8 jours) ;
→ 1 explant + autre organe (intestin, mésonéphros, poumon du même âge) ;
1 explant seul.

Comme on l'a vu, le foie d'un embryon de 6 jours donne 6 explants ; ces 6 explants sont utilisés dans deux groupes expérimentaux parallèles ; la comparaison entre ces deux groupes montre si les différents explants provenant d'un même foie se comportent bien de la même manière dans des associations analogues.

Deux associations peuvent être cultivées dans une « salière ». Dans le cas général ces deux associations sont de la même nature, par exemple deux « foie + pancréas » ou deux « foie seul » ; un autre protocole expérimental avait été adopté au début des recherches : un explant « témoin » et un explant « expérimental » étaient cultivés sur la même salière. Mais des résultats d'un autre ordre, qui seront analysés plus loin, se sont manifestés dans ces séries et ont fait rejeter ce protocole.

A. — Influence du pancréas de 14 jours sur le foie de 6 jours.

Il s'agit d'une série d'exploration dans laquelle les explants expérimentaux et leurs témoins respectifs ont été fixés après différents délais de

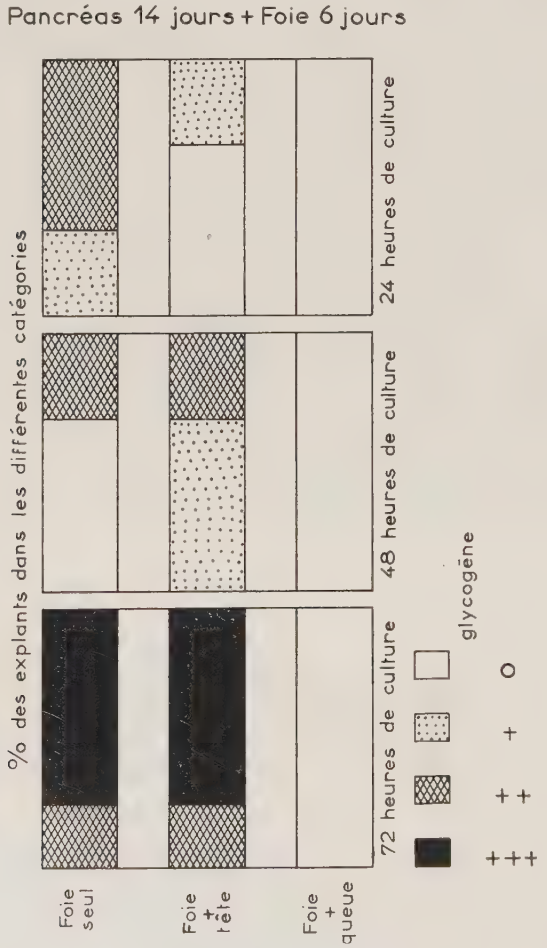


Fig. 83. — Diagramme de l'évolution du glycogène dans les explants de foie associés au pancréas de 14 jours.

culture, entre 24 heures et 3 jours après l'explantation. Les associations sont faites suivant le schéma type : des fragments de foie de 6 jours sont mêlés en mosaïque soit à des fragments de la queue du pancréas de 14 jours, soit à des fragments de la tête du pancréas, soit enfin disposés seuls, en contact étroit les uns avec les autres. Dès 24 heures de culture, les différents éléments d'une association se sont soudés, formant un explant homogène aux contours arrondis. A l'intérieur de l'explant, les tissus hépatique et pancréatique, accolés l'un à l'autre ou même étroitement imbriqués, sont généralement séparés l'un de l'autre par une membrane fibroblastique ; il existe parfois un contact direct entre l'épithélium pancréatique et le parenchyme hépatique. Les différents éléments de chaque association peuvent être distingués macroscopiquement pendant tout le temps de la culture ; le foie a un aspect complètement transparent et homogène, tandis que le pancréas montre des taches blanches opaques, de forme ronde, qui représentent la composante épithéliale de l'organe, c'est-à-dire, soit des îlots, soit des tubules primitifs.

Le détail des résultats est consigné dans un tableau et représenté par un schéma graphique dont le principe a été expliqué au chapitre des méthodes (fig. 83). Cette série porte sur un total de 30 explants. Ces explants ayant été fixés après différents délais de culture, leur nombre dans chaque catégorie est faible, mais l'évolution des quantités de glycogène présentes dans les différents types d'explants est facile à apprécier :

Nombre total d'explants		Durée de culture	Nombre d'explants contenant des quantités données de glycogène			
			0	+	++	+++
Foie seul	10	24 heures		1	2	
		48 heures	2		1	
		72 heures			1	3
Foie + tête du pancréas . .	10	24 heures	2	1		
		48 heures		2	1	
		72 heures			1	3
Foie + queue du pancréas . .	10	24 heures	3			
		48 heures	3			
		72 heures	4			

On peut dégager un certain nombre de constatations :

1° Les explants de foie seul manifestent une certaine variabilité, comme cela a déjà été montré au chapitre précédent ; cependant, bien que deux explants cultivés pendant 48 heures soient restés vides de glycogène, considérés dans leur ensemble, les 10 explants de foie seul montrent une tendance à l'accumulation croissante du glycogène pendant les trois premiers jours de la culture (fig. 84).

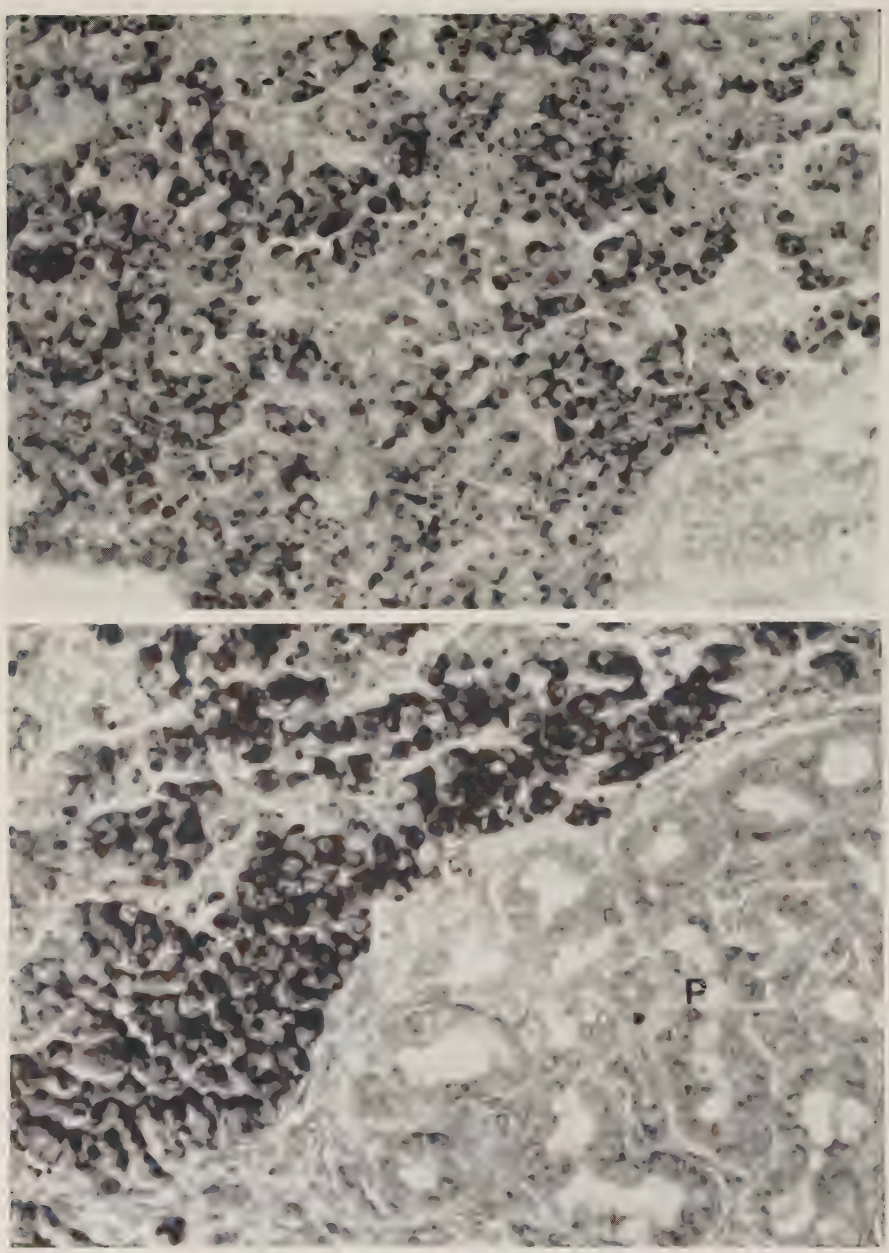


Fig. 84. — Explant de foie de 6 jours cultivé 3 jours.
Glycogène abondant. Gendre, APS. × 385.

Fig. 85. — Explant de foie de 6 jours associé à la tête du pancréas de 14 jours (P).
3 jours de culture. Glycogène très abondant. APS. × 385.

2° De même, il n'y a pas de glycogène dans deux associations « foie + tête », cultivées pendant 24 heures. Mais dans l'ensemble les fragments de foie associés à des fragments des branches ventrales du pancréas de 14 jours, donc à du tissu tubulaire et à des îlots B, contiennent du glycogène en assez grande abondance. On voit clairement d'après le graphique que les quantités de glycogène formées dans les explants « foie — tête » et « foie seul » sont à peu près du même ordre de grandeur. En fait, l'observation individuelle des explants montre une légère surcharge dans les explants mixtes « foie + tête » comparés aux explants « foie seul » issus du même organe.

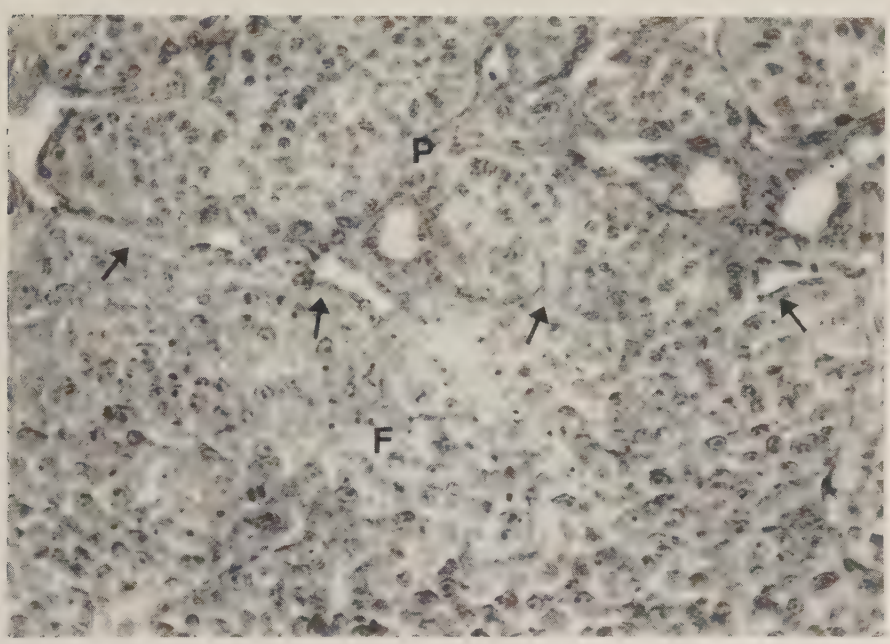


Fig. 86. — Explant de foie de 6 jours (F) associé à la queue du pancréas (P) de 14 jours. 3 jours de culture. Les flèches indiquent la frontière entre les deux tissus. Pas de glycogène. × 385.

Il n'est pas possible pourtant d'attribuer une influence favorable spécifique des îlots B de l'explant pancréatique dans ce cas ; ceci pour deux raisons : d'abord, la méthode d'appréciation des quantités de glycogène n'est pas assez précise pour permettre d'affirmer des différences qui sont de l'ordre de grandeur des variations fortuites : ensuite, on a vu au cours de l'étude du comportement du foie *in vitro*, qu'un organe quelconque placé en parabiose avec le foie exerce une influence favorisante sur l'accumulation de glycogène, probablement par un mécanisme trophique. Cette expérience ne peut donc démontrer la présence d'insuline même dans les pancréas les plus âgés. Les associations « foie + tête » constituent un deuxième type de témoin (fig. 85).

3° Par contre, les associations « foie + queue du pancréas » donnent une démonstration éclatante de l'influence des îlots A sur la présence du glycogène dans le tissu hépatique. Quelle que soit la durée de culture, aucun de ces explants ne montre de glycogène (fig. 86) (3e colonne du graphique). Il y a donc dans la queue du pancréas de 14 jours, dès le moment de l'explantation et pendant toute la durée de la culture, un principe inhibiteur de la formation de glycogène. Il ne peut s'agir que du glucagon. En effet, l'association avec les régions pancréatiques dépourvues d'îlots A sécréteurs de glucagon n'a pas cette influence, au contraire. De même, d'autres organes associés au foie favorisent plutôt la formation de glycogène ; l'inhibition de la formation de glycogène dans l'explant de foie est une propriété spécifique de la queue du pancréas. Cette inhibition est assez puissante pour empêcher complètement, dès le début de la culture et pendant toute sa durée, toute apparition de glycogène dans tous les explants.

4° Les contrastes les plus nets entre la charge en glycogène des deux types d'explants hépatiques témoins (foie seul et foie + tête du pancréas) et les explants hépatiques associés à la queue s'observent après trois jours de culture ; c'est le délai que nous avons adopté par la suite.

B. — Influence du pancréas de 10 jours sur le foie de 6 jours.

Les explantations sont faites suivant le même protocole. Une différence cependant : à 14 jours, la queue du pancréas était découpée en fragments et pouvait éventuellement être incorporée à plusieurs associations ; au contraire, la queue du pancréas de 10 jours, plus petite et plus mince,

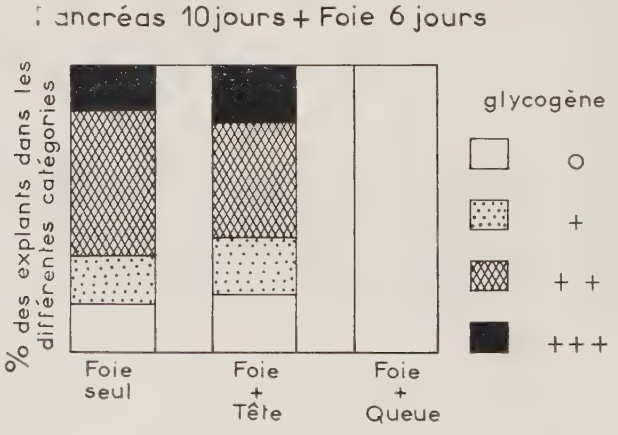


Fig. 87. — Diagramme de l'évolution du glycogène dans les explants de foie associés au pancréas de 10 jours.

est explantée entière et entourée des fragments de foie. Dans ce cas comme dans l'autre, l'aspect du tissu insulaire est le même ; la fragmentation de l'organe ne nuit pas à la cicatrisation des explants par formation d'une membrane périphérique de fibroblastes. On obtient simplement une intrication plus ou moins profonde des tissus hépatique et pancréatique, qui influe peu sur le résultat des expériences. De même, la tête du pancréas est explantée à peu près dans sa totalité et associée à des fragments de foie correspondant. Enfin, des fragments provenant du même foie constituent un explant témoin. Cette série a donné les résultats suivants (fig. 87) :

	Nombre total d'explants	Nombre d'explants contenant des quantités de glycogène données			
		0	+	++	+++
Foie	12	2	2	6	2
Foie + tête	10	2	2	4	2
Foie + queue	9	9			

On voit que les résultats sont absolument comparables à ceux de la première série : il y a une certaine variabilité des quantités de glycogène formées dans les explants de foie seul ou les explants de foie associés à la tête du pancréas ; 4 d'entre eux, même, n'en ont pas élaboré. Néanmoins, ces explants contrastent fortement avec les explants de foie associés aux îlots A, puisque aucun de ces derniers ne contient de glycogène. On peut donc affirmer que la queue du pancréas de l'embryon de 10 jours inhibe encore complètement la formation de glycogène dans le foie.

Il est intéressant d'analyser en détail la structure d'une des associations tête + foie ; le foie est scindé en deux masses complètement distinctes, situées de part et d'autre de l'explant pancréatique. Une des masses de tissu hépatique est riche en glycogène, alors que l'autre en est dépourvue (fig. 88). L'examen attentif de l'explant montre la présence de deux grands îlots au contact du tissu hépatique vide. D'après l'aspect de ces îlots et l'état du tissu hépatique, on peut conclure qu'il s'agit d'îlots A (on a vu dans la première partie, qu'il n'y a pas une séparation nette entre la branche splénique qui contient les îlots A et les branches ventrales et que ces dernières montrent de ces îlots au niveau de leurs canaux excréteurs). Il semble donc que ces deux îlots aient exercé une action limitée localement au tissu hépatique en contact. On retrouvera d'autres exemples de telles actions de contact dans les expériences mettant en jeu des pancréas plus jeunes et par conséquent moins actifs.

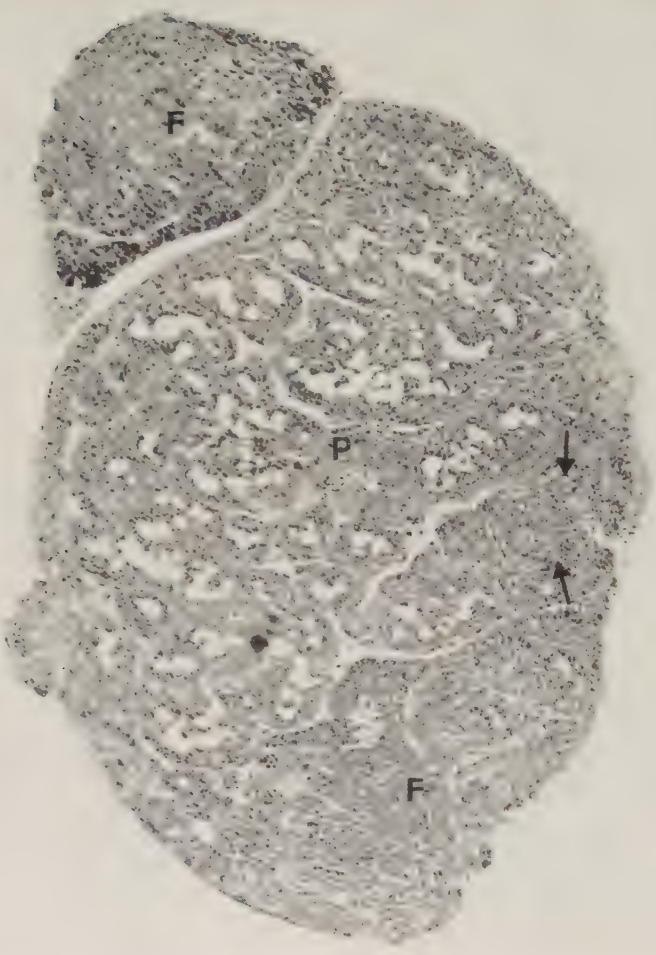
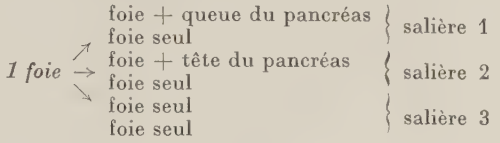


Fig. 88. — Association *in vitro* entre le foie de 6 jours (F) et la tête du pancréas de 10 jours (P). Une partie du foie est riche en glycogène, l'autre n'en contient pas : au contact de cette dernière on constate la présence de 2 îlots (flèche). APS. × 103.

C. Influence du pancréas de 8 jours sur le glycogène hépatique et diffusion de l'effet dans le milieu de culture.

Dans cette série expérimentale destinée à rechercher l'influence du pancréas de 8 jours sur le glycogène du foie associé, deux types de témoins de foie seul ont été adoptés : les uns cultivés sur des salières, portant uniquement du foie, les autres explantés sur des milieux portant une

association de foie, soit avec la queue, soit avec la tête du pancréas. Le schéma des expériences est le suivant :



Les résultats sont les suivants (fig. 89).

Type d'explants	Nombre total d'explants	Nombre d'explants hépatiques contenant des quantités de glycogène données		
		0	+	++
Foie seul.	11	4	3	4
Foie + tête	7	0	4	3
Foie seul sur salière tête . .	7	0	2	5
Foie + queue.	8	8		
Foie seul sur salière queue. .	8	7	1	

Notons d'abord que l'activité glycogénique des explants de foie est assez faible dans cette série, puisque aucun explant ne se classe dans la catégorie supérieure +++. Cependant les contrastes sont nets et permettent un certain nombre de conclusions.

En premier lieu la queue du pancréas de 8 jours exerce une inhibition totale sur la synthèse de glycogène dans l'explant de foie associé, comme

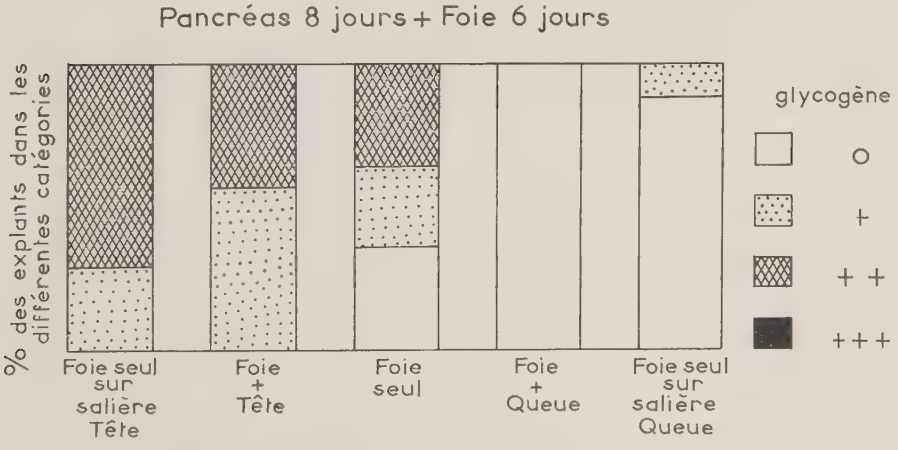


Fig. 89. — Diagramme de l'évolution du glycogène dans les explants de foie associés au pancréas de 8 jours.

le fait la queue du pancréas plus âgé. Par contre, la parabiose avec la tête du pancréas semble avoir eu une certaine influence stimulante sur la fonction glycogénique des explants ; toutefois la variation peut être accidentelle.

Une autre conclusion très nette, c'est que le facteur inhibiteur de la glycogenèse diffuse dans le milieu de culture. En effet, les explants de foie seul cultivés sur un milieu portant la queue du pancréas, et à une certaine distance de celle-ci, sont vides de glycogène. Au contraire, la présence de la tête du pancréas aurait plutôt favorisé la formation de glycogène, aussi bien dans les explants directement associés que dans les fragments de foie cultivés à distance sur le même milieu.

Pour la suite des expériences, cet effet de diffusion nous a fait abandonner la culture sur le même milieu des explants témoins et expérimentaux.

D. — Influence du pancréas entier de 5 jours, 6 jours et 7 jours sur le glycogène hépatique.

Avant 7 jours l'ébauche pancréatique est explantée entière ; en effet aux stades jeunes elle est de très petite taille ; par ailleurs, l'étude histologique (1re partie) a montré la place prépondérante occupée par l'organe insulaire dans le pancréas jeune, et la précocité de la différenciation des cellules A par rapport aux cellules B. Enfin, les séries expérimentales précédentes ont démontré que l'influence glycogénolytique s'exerce puissamment tandis qu'une influence des cellules B est très difficile à mettre en évidence ; il est donc probable qu'un facteur glycogénolytique éventuellement présent dans le pancréas jeune se manifestera malgré la présence dans l'association de tubules primitifs ou de cellules B. D'autre part, la microscopie électronique montre la présence de granulations α dans le pancréas de 5 à 7 jours. Ces grains correspondent-ils à un produit hormonal achevé du point de vue chimique et suffisamment abondant pour manifester un effet *in vitro* ? En faisant des associations suivant les schémas suivants :

1 foie de 6 jours → ↗ 2 explants de foie seul ;
→ 2 explants de foie + pancréas entier de 7 jours ;
↘ 2 explants de foie + pancréas entier de 6 jours ;

1 foie de 6 jours → ↗ 2 explants de foie seul ;
→ 2 explants de foie + pancréas entier de 6 jours ;
↘ 2 explants de foie + pancréas entier de 5 jours ;

nous espérions déterminer la frontière entre des pancréas actifs et des pancréas inertes ; en effet vers 6-7 jours, l'histologie montre une augmentation explosive de la quantité des granulations α. En fait, les résultats se sont révélés indépendants de l'âge des explants pancréatiques (fig. 90) :

Type d'explants	Nombre total d'explants	Nombre d'explants hépatiques contenant une quantité de glycogène donnée			
		0	+	++	+++
Foie seul.	39	6	9	16	8
Foie + pancréas, 7 jours. . .	15	12	1	1	1
Foie + pancréas, 6 jours. . .	18	14	2	1	1
Foie + pancréas, 5 jours. . .	11	11			

Pour la première fois par rapport aux séries précédentes, du glycogène s'est formé dans certains explants hépatiques associés au pancréas insulaire. Mais la proportion de ces explants par rapport aux explants vides de glycogène est très faible. En outre, le diagramme montre qu'il n'y a pas de corrélation entre l'inhibition du glycogène et l'âge des explants.

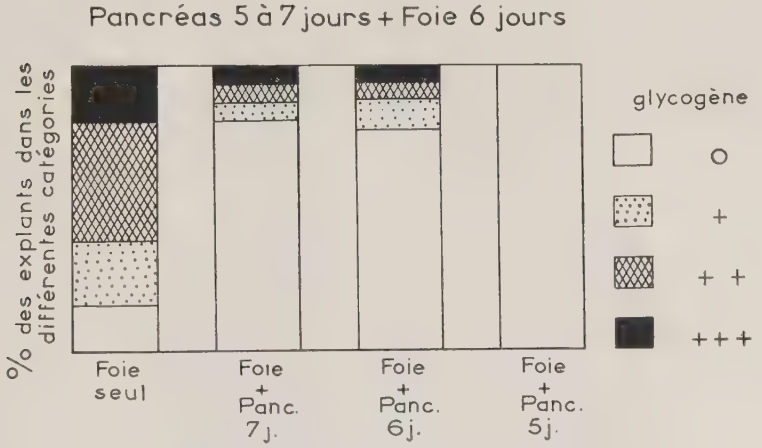


Fig. 90. — Diagramme de l'évolution du glycogène dans les explants de foie associés au pancréas de 5 à 7 jours.

Il faut tenir compte de plusieurs éléments dans l'appréciation de ces observations :

1° Dans cette série, la fonction glycogénique du tissu hépatique est particulièrement active (colonne 1 du diagramme) ; il est donc probable qu'une plus grande activité glycogénolytique était nécessaire pour l'inhiber.

2° Puisque le pancréas est explanté dans sa totalité, il est possible que la proportion des îlots ait été plus faible.

3° La localisation du glycogène, quand il est présent dans les explants hépatiques en association, est significative ; il est souvent limité à des

zones plus ou moins étendues, et toujours séparé du tissu insulaire par une zone de parenchyme hépatique vide de glycogène. Il semble que l'activité glycogénolytique qui se propage par diffusion à travers les cellules

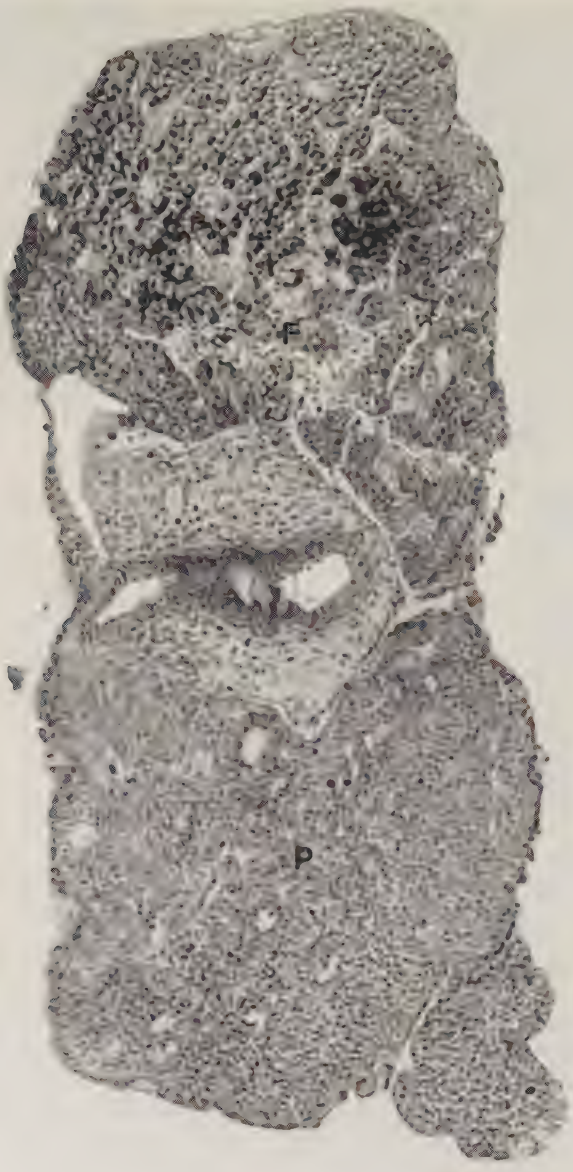


Fig. 91. — Association *in vitro* entre le foie de 6 jours (F) et le pancréas de 7 jours (P). L'effet glycolytique est limité par l'interposition d'une large bande de mésenchyme. APS. × 103.

ait été trop faible pour atteindre les zones les plus éloignées. Dans un cas (fig. 91), une bande de mésenchyme s'interpose entre le tissu hépatique et le tissu insulaire ; il y a tout de même au contact du mésenchyme une zone de foie vide. Cette disposition apparaît particulièrement significative lorsqu'on la compare à la distribution du glycogène dans les explants de foie associés à la *tête* du pancréas dans les séries plus âgées ; dans ces cas-là, c'est au contraire au contact du tissu pancréatique (tubulaire ou insulaire B) que le glycogène est plus abondant.

4° Le pancréas de 5 jours a été actif dans 100 0/0 des cas, ce qui est probablement fortuit.

En conclusion, on peut affirmer que le facteur glycogénolytique est déjà présent dans le pancréas de 5 à 7 jours, mais on n'observe plus l'inhibition totale obtenue à partir des stades ultérieurs ; cependant, il n'est pas possible, au moins sur le nombre d'expériences dont nous disposons, de montrer un accroissement régulier de l'effet pendant cette période de l'incubation. On peut admettre l'interprétation suivante : à partir de 8 jours, le facteur glycogénolytique est si abondant dans le pancréas qu'il inhibe totalement la formation de glycogène. Dans les pancréas plus jeunes, la quantité de glucagon sécrétée, beaucoup moins importante, peut dans certains cas se trouver à la limite d'efficacité, ceci se manifestant par la formation de glycogène dans une petite proportion des explants et par un gradient spatial de l'inhibition dans ces explants.

E. — Influence du pancréas de 4 jours sur le glycogène hépatique.

Le prélèvement du pancréas chez l'embryon de 4 jours ne pose pas de problème malgré sa très petite taille, cependant il n'est pas possible de distinguer les différentes ébauches ; les résultats de la culture montrent que dans la plupart des cas, seul le bourgeon dorsal est explanté. Dans un cas que nous trouvons intéressant de signaler (fig. 92), on observe deux bourgeons distincts, l'un de nature insulaire, l'autre de nature tubulaire. L'ébauche explantée est donc petite, mais pourtant proportionnée par rapport à la quantité de foie.

Les témoins dans cette série sont constitués par du foie seul et par du foie associé à des fragments de mésonéphros des embryons de 4 jours ; ces témoins sont destinés à éliminer la possibilité d'une influence défavorable des organes très jeunes sur la formation du glycogène hépatique. Le protocole des expériences est le suivant :

1 foie de 6 jours → ↗ 2 explants de foie seul ;
→ 2 explants de foie + mésonéphros de 4 jours ;
↘ 2 explants de foie + pancréas de 4 jours.

Le tableau donne les quantités de glycogène observées dans les différents explants :

Type d'explant	Nombre total	Nombre d'explants hépatiques contenant une quantité de glycogène donnée			
		0	+	++	+++
Foie seul.	19	8	3	6	2
Foie + mésonéphros	19	4	6	7	2
Foie + pancréas	20	14	4		2

ce qui se traduit par le diagramme (fig. 93).

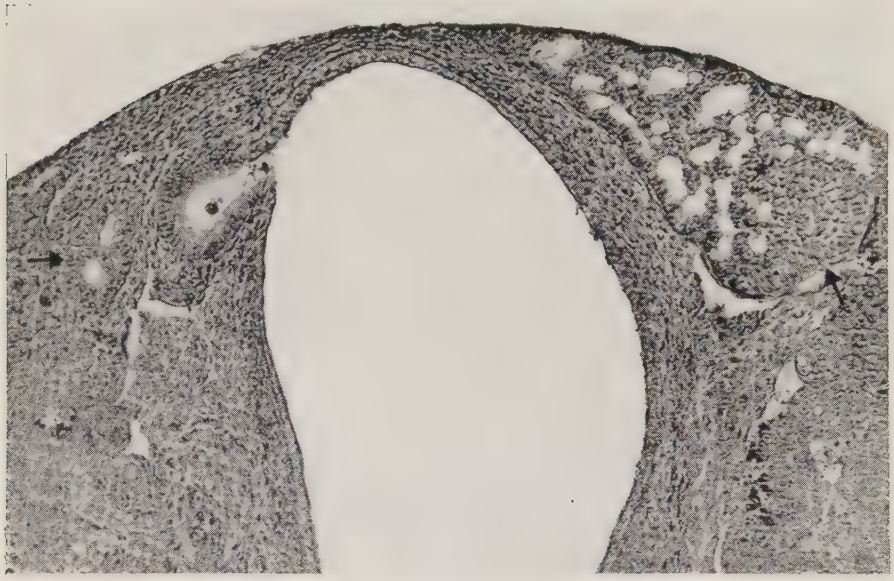


Fig. 92. — Pancréas de 4 jours cultivé 3 jours. On distingue 2 ébauches pancréatiques de part et d'autre de la vésicule épithéliale d'origine intestinale. L'une de ces ébauches contient des îlots (flèche) (ébauche dorsale), l'autre est de type tubulaire (flèche). APS. × 124.

Dans cette série l'activité glycogénique des foies isolés se situe à un niveau général assez faible. La présence du mésonephros dans les parabioses a plutôt favorisé la formation de glycogène. Par contre, on voit que dans 70 0/0 des cas, la présence de l'ébauche pancréatique dorsale a totalement inhibé l'apparition de glycogène. La comparaison entre les parabioses et les explants témoins montre que l'inhibition s'exerce d'autant

plus facilement que l'accumulation de glycogène dans le foie seul est plus faible. De plus, le pancréas qui, dans ces parabioses, constitue le centre des explants, est entouré d'une large couronne de foie vide de glycogène et ce sont les cellules hépatiques périphériques qui contiennent du glycogène, lorsque l'inhibition n'a pas été totale.

L'ensemble des résultats, ainsi que ces aspects particuliers, démontrent la capacité du pancréas de 4 jours d'inhiber la formation de glycogène dans le foie.

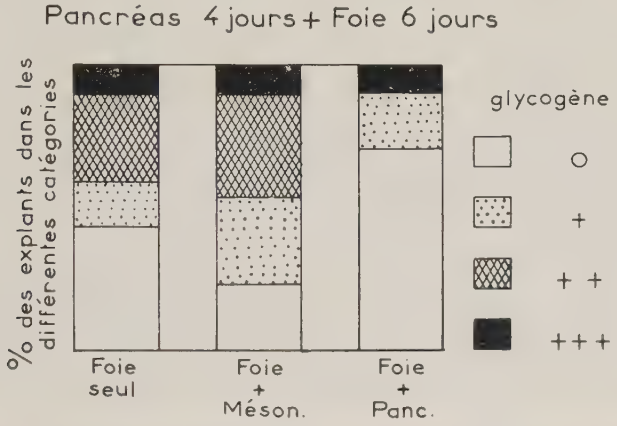


Fig. 93. — Diagramme de l'évolution du glycogène dans le foie de 6 jours associé au pancréas de 4 jours.

F. — Influence de l'ébauche pancréatique dorsale de l'embryon de 3 jours sur le glycogène hépatique.

Puisque le pancréas de 4 jours se révèle actif, la dernière série expérimentale devait éprouver les capacités de l'ébauche dorsale de l'embryon de 3 jours ; les embryons utilisés sont incubés suivant les cas 72 ou 76 heures ; leur degré de développement se situe entre les stades 19 et 23 de Hamburger et Hamilton. Avant ce stade, le bourgeon pancréatique dorsal est trop petit pour être explanté. Les résultats de la culture montrent

Type d'explant	Nombre total	Nombre d'explants contenant une quantité de glycogène donnée			
		0	+	++	+++
Foie seul.	11	1	2	5	3
Foie + mésonéphros	7	1	1	2	3
Foie + pancréas.	9	7	1	1	

que l'ébauche a toujours été prélevée correctement malgré sa petite taille ; elle est accompagnée d'un fragment d'épithélium intestinal et dans certains cas de la splanchnopleure. Comme dans la série précédente les

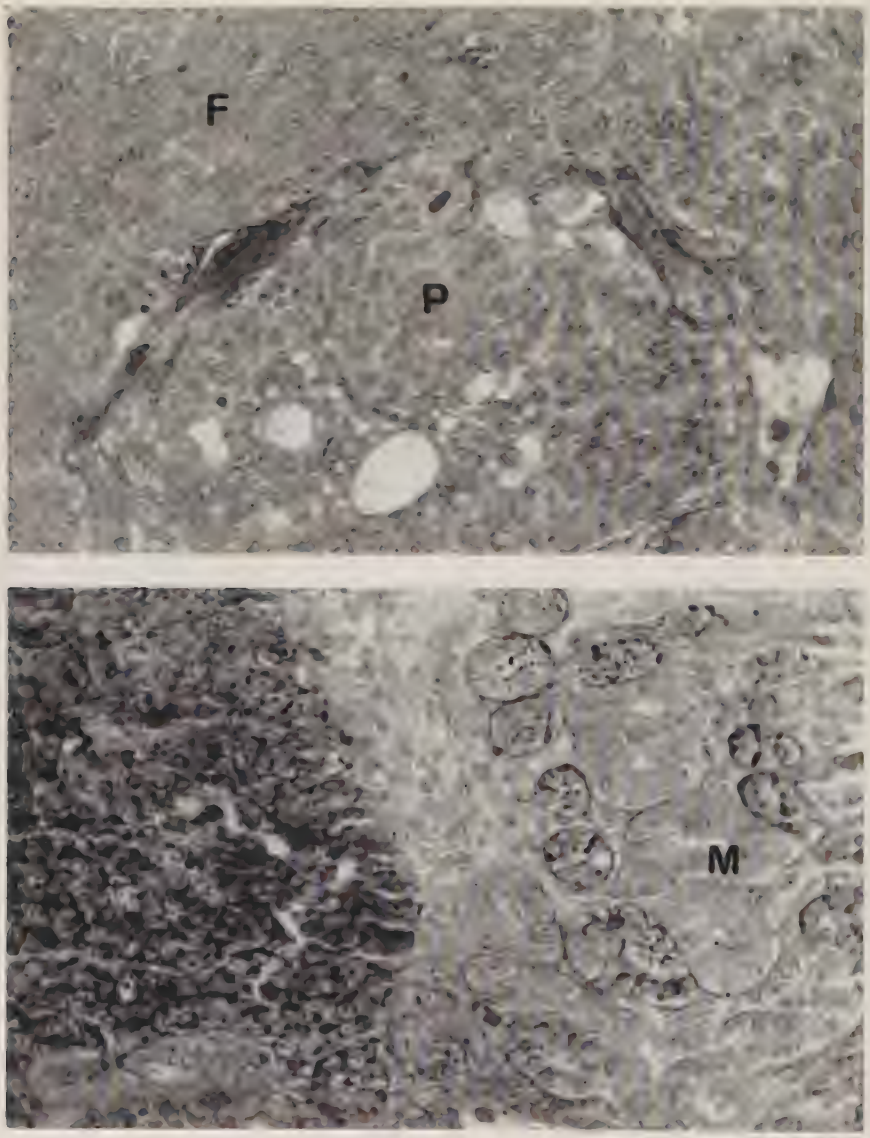


Fig. 94. – Parabiose *in vitro* entre le foie de 6 jours (F) et l'ébauche dorsale du pancréas de 3 jours (P). Pas de glycogène. Remarquer les grosses vacuoles typiques des cellules bordant la cavité centrale du bourgeon. Une capsule collagénique assez épaisse s'est formée entre les îlots et le foie. APS. × 462.

Fig. 95. — Parabiose témoin entre le foie de 6 jours et du mésonéphros de 6 jours (M). Glycogène abondant dans le foie ainsi que dans certains tubules du mésonéphros. APS. × 462.

témoins sont constitués soit par des explants de foie isolé, soit par des explants de foie associé à du mésonéphros (fig. 94 et 95). Les résultats sont donnés dans le tableau et le diagramme (fig. 96).

On voit que le contraste entre les différentes colonnes du diagramme est d'un type analogue à celui des séries précédentes. Il faut en conclure que l'ébauche dorsale primitive du pancréas manifeste déjà une activité fonctionnelle spécifique à la fin du troisième jour.

Donc, lorsque le bourgeon dorsal est suffisamment individualisé par rapport à l'intestin pour pouvoir en être isolé, il manifeste déjà une activité glycogénolytique. Il n'a pas été possible de définir le stade exact de

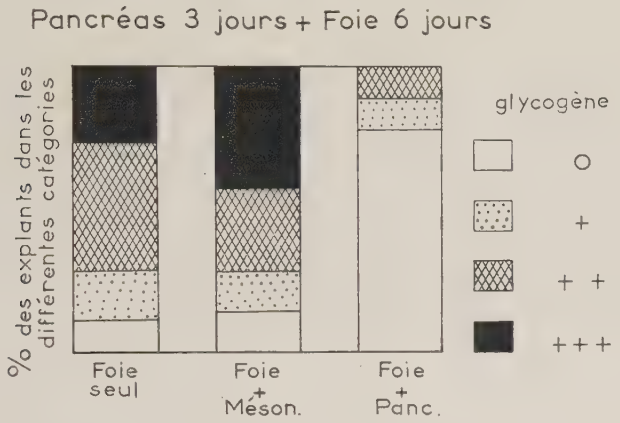


Fig. 96. — Diagramme de l'évolution du glycogène dans les explants de foie associés au pancréas de 3 jours.

l'apparition de cette activité, qui se situe peut-être avant même l'évagination de la première ébauche pancréatique hors de l'endoderme intestinal.

DISCUSSION

Les résultats expérimentaux rapportés dans cette troisième partie permettent de dégager un certain nombre de données relatives à la différenciation du foie et du pancréas, qui seront discutées dans l'ordre suivant :

1° les relations entre l'épithélium et le mésenchyme dans l'organogenèse du pancréas ;

2° le glycogène hépatique en culture ;

3° la différenciation morphologique et l'activité fonctionnelle des îlots en culture.

Enfin nous examinerons l'ensemble de nos résultats par rapport aux données actuelles sur la régulation par les hormones pancréatiques du métabolisme glucidique de l'embryon de Poulet.

1° *Les relations épithélium-mésenchyme dans l'organogenèse du pancréas.*

Dans le premier chapitre ont été décrits les aspects limités de dégénérescence cellulaire qu'on trouve dans le pancréas embryonnaire chez le Poulet. Ces phénomènes ont été signalés par différents observateurs, *in vivo* comme *in vitro* : Potvin et Aron (1927) ; Villamil (1942), Black et Comolli (1954). Nos expériences ont montré que ces processus prennent *in vitro* une extension d'autant plus importante et anarchique que la quantité de mésenchyme qui accompagne l'ébauche épithéliale est plus faible. La présence de mésenchyme nécrosé suffit à régulariser le phénomène. Il semble donc que, chez l'embryon de Poulet, l'épithélium pancréatique possède cette faculté particulière de se creuser, faculté qui est limitée par la présence du mésenchyme. Il est vraisemblable que ce processus est à l'origine de la formation de lumières dans les cordons pleins. Cependant la pauvreté des explants en mésenchyme n'empêche pas la persistance de la différenciation des îlots. Ces observations sont assez différentes de celles qu'on a pu faire chez les Mammifères : l'épithélium pancréatique de l'embryon de Souris de 11 jours, explanté seul, reste indifférencié ou se désagrège peu à peu, par perte des cellules périphériques (Golosow et Grobstein, 1962 ; Kallman et Grobstein, 1964).

2° *Le glycogène hépatique en culture.*

Le premier phénomène remarquable est l'apparition précoce du glycogène dans le foie de 4 jours cultivé. Lövlie (1959) a fait des observations analogues en culture histiotypique. Par contre *in ovo* on n'a jamais pu obtenir un dépôt anticipé de glycogène hépatique. Pour comprendre la différence de comportement entre le foie dans l'embryon et le foie isolé, il faudrait connaître l'équipement enzymatique de la cellule hépatique ; mais cet équipement avant 7 jours d'incubation est encore mal connu. La phosphorylase n'apparaît qu'à 7 jours ; ce point sera discuté plus longuement à propos de la dégradation du glycogène. Grillo et Ozone (1962) postulent l'existence d'une autre voie de synthèse du glycogène, celle de l'uridine-diphosphate-glucose glycogène-synthétase (U. D. P. G.), dans le foie de 6 jours. S'il est impossible d'obtenir, dans l'embryon entier, la formation précoce de glycogène, il se peut que des mécanismes de contrôle, en particulier la régulation par la membrane du sac vitellin, s'opposent à l'élévation de la quantité de glucose disponible dans l'embryon. En effet, Zwilling (1951) a montré que l'injection d'insuline à l'embryon de 5 jours provoque l'augmentation des hydrates de carbone de la membrane vitelline, aux dépens de ceux de l'embryon qui diminuent. L'absence de ces mécanismes pourrait expliquer l'apparition

de glycogène en culture. Par ailleurs, on commence à entrevoir que des transformations profondes du métabolisme interviennent, lorsqu'un organe est explanté *in vitro* ; certaines enzymes, en particulier, sont susceptibles d'apparaître avec plusieurs jours d'avance sur le développement normal ; c'est ce qui a été démontré sur la rétine nerveuse, pour la glutamine synthétase, enzyme typique du tissu nerveux (Moscona et Hubby, 1963 ; Kirk et Moscona, 1963). La formation précoce de glycogène par le foie cultivé doit probablement s'expliquer par l'apparition d'enzymes nouvelles.

Le deuxième point à considérer est l'évolution du glycogène dans les explants au cours du temps, évolution qui est indépendante de l'âge des embryons au moment du prélèvement et qui se déroule de la manière suivante :

— apparition dès 24 heures de culture ; — augmentation jusqu'à 3 jours ; — disparition plus ou moins rapide.

Ce schéma est d'ailleurs sujet à de larges variations.

Or, Lövlie (1959), ainsi que Verne et Hébert (1963 *a*) trouvent, en cultivant des lames de tissu hépatique, selon le mode histiotypique, que la quantité maximum de glycogène est formée après 24 heures de culture puis diminue ensuite. La chronologie des phénomènes, par ailleurs semblables, est donc différente entre ces expériences et les nôtres et peut probablement s'expliquer par la différence des conditions de culture ; en effet, on possède à l'heure actuelle des indications selon lesquelles le métabolisme cellulaire est modifié par l'explantation en culture organotypique et altéré encore plus profondément par la culture histiotypique. Verne et Hébert constatent que la disparition du glycogène dans les explants coïncide avec l'appauvrissement du milieu de culture en glucose.

L'évolution générale du glycogène dans les explants de foie étant ainsi définie, les expériences montrent d'importantes variations des quantités de glycogène formé. En général, ces quantités sont relativement homogènes dans une même série expérimentale. *In vivo* également, l'accumulation du glycogène est sujette à des fluctuations ; Rimniceanu, Miclea et Lungulescu-Dragan (1955) notent la variabilité de la date d'apparition du glycogène chez l'embryon selon la période de l'année. Il semble que ces phénomènes saisonniers puissent être expliqués par des variations dans la quantité de matériaux nutritifs présents dans l'embryon ou dans les organes explantés. De tels phénomènes ne sont pas exceptionnels : ils ont été observés par Kieny (1958) sur les os embryonnaires dont les besoins nutritifs en milieu synthétique varient suivant le moment de l'année où ils sont explantés.

Une dernière question se pose : le foie de l'embryon de 6 jours est-il sensible à l'action du glucagon ? Grillo (1960, 1961 *a*), Thommes et Firling (1964) trouvent qu'une injection de glucagon à l'embryon de 6 jours provoque immédiatement une diminution du glycogène hépatique. En ce qui concerne les différentes enzymes qui interviennent dans la

dégradation du glycogène, les données sont contradictoires. Grillo (1961 *d*) trouve dans le foie de 7 jours la forme *b*, inactive, de la phosphorylase (déphosphophosphorylase) : c'est cette forme qui est activée par le glucagon. Par contre, pour Guha et Wegmann (1961), jusqu'à 12 jours, le foie embryonnaire ne contiendrait que la forme *a*, active, de la phosphorylase ; Bot, Andrassy et Kovacs (1960) trouvent également la forme active de la phosphorylase, mais à partir de 13 jours seulement. Signalons encore que Kilsheimer, Ashmore et Nesbett (1960) trouvent la glucose-6-phosphatase, enzyme qui catalyse la dernière réaction de la glycogénolyse, dans le foie de l'embryon de 60 heures ; ce résultat suggère que la cellule hépatique présente une différenciation enzymatique précoce.

On voit donc que les mécanismes par lesquels la cellule hépatique jeune peut synthétiser ou dégrader le glycogène sont loin d'être élucidés ; néanmoins les données dont on dispose actuellement indiquent que ces processus peuvent effectivement avoir lieu en culture.

3° *La différenciation morphologique et l'activité fonctionnelle des îlots en culture.*

A. — Les îlots A

Des observations morphologiques comme des expériences d'association, on peut conclure que le glucagon continue à être élaboré et libéré en culture. En effet, les grains α sont visibles à l'échelle optique et ultrastructurale. Ces observations sont en accord avec celles de Ghiani et Orsi (1962) qui voient persister les grains α colorés par la phloxine de la coloration de Gomori dans les ébauches pancréatiques de plus de 5 jours, cultivées 2 à 4 jours. Les observations ultrastructurales apportent la preuve décisive de la présence de ces grains ; en outre, nos recherches expérimentales démontrent qu'une activité spécifique correspond à la présence des grains.

L'inhibition de la formation du glycogène dans le foie associé est bien un effet spécifique : aucun autre organe explanté en parabiose avec du foie (mésonéphros, poumon, thyroïde, intestin) n'empêche l'élaboration de glycogène. Au contraire, l'association exerce généralement une influence stimulante sur l'accumulation de glycogène. Mais la spécificité de l'effet inhibiteur et sa localisation au niveau des cellules A sont démontrées encore plus indiscutablement par l'opposition complète entre les associations qui contiennent soit le lobe splénique, soit la tête du pancréas : seul le lobe splénique, au niveau duquel sont localisés les îlots A, exerce une inhibition de la fonction glycogénique. Ce protocole expérimental démontre donc la ségrégation des îlots A dans le lobe splénique.

Cependant l'étude histogénétique et ultrastructurale a démontré la présence constante dans le lobe splénique de cellules B réparties en un

gros îlot et plusieurs petits îlots. Comment se fait-il que ces îlots sécréteurs d'insuline ne contrecarrent pas l'effet glycogénolytique des îlots A ? Ceci s'explique facilement par des facteurs quantitatifs et physiologiques. En premier lieu, il existe une disproportion importante entre les volumes des tissus insulaires A et B. Cette disproportion, bien connue chez l'adulte, s'établit donc déjà au cours de la vie embryonnaire.

En plus de cette disproportion de volume entre les îlots A et B, il faut considérer d'autres facteurs :

1° La différenciation des îlots B *in vivo* et *in vitro* est plus tardive et moins poussée que celle des îlots A.

2° Vuylsteke et De Duve (1955) ont démontré que l'insuline renforce l'effet glycogénolytique du glucagon en le protégeant de l'inactivation par les cellules hépatiques incubées pendant quelques heures. Verne et Hébert (1963 *b*) ont montré que cet effet se manifeste également et se prolonge pendant plusieurs jours dans des cultures histiotypiques de foie d'embryon de Poulet, lorsque glucagon et insuline sont introduits en association dans le milieu de culture du foie.

Nos expériences ont montré qu'il n'est pas possible de trouver un stade limite au-dessous duquel l'ébauche pancréatique n'inhibe pas encore la formation de glycogène. L'ébauche dorsale de l'embryon de 3 jours, formée depuis quelques heures, manifeste déjà cette propriété. Ce résultat, à première vue surprenant, est confirmé par la présence de grains α décelables à l'échelle ultrastructurale. Il nous semble que la convergence des résultats obtenus par ces deux voies d'investigation constitue un argument solide en faveur de la différenciation spécifique précoce des cellules de l'ébauche pancréatique.

Il faut reconnaître que l'appréciation de la quantité de glycogène dans les explants par la méthode visuelle est imprécise. Cependant l'interprétation des résultats concernant les explants de foie associés au lobe splénique du pancréas de plus de 8 jours est sans ambiguïté : en effet dans ces explants il n'y a jamais de glycogène. Par contre certains explants de foie associés au pancréas de 3 à 8 jours contiennent un peu de glycogène. Malgré ces résultats plus nuancés, nous avons considéré l'inhibition par le glucagon comme incontestable : c'est qu'il y a une différence significative entre la proportion d'explants hépatiques témoins et la proportion d'explants hépatiques associés contenant du glycogène. On peut conclure de cette analyse qu'il se produit à partir de 8 jours d'incubation un accroissement important de la sécrétion. Cette différence quantitative pourrait sans doute expliquer les résultats de Drukker (1961, 1964) : cet auteur, qui a reproduit nos expériences d'association, ne trouve d'effet glycogénolytique qu'à partir de 8 jours. Il décrit, en outre, un effet stimulant de la surrénale sur l'élaboration de glucagon, elle-même jugée d'après l'effet sur le foie. Il nous semble difficile de distinguer de tels degrés dans l'inhibition par cette méthode.

Un dernier résultat intéressant a été acquis par les expériences de culture.

Le glucagon diffuse dans le milieu, puisque des fragments de foie cultivés à distance du lobe splénique, sur le même milieu, sont vides de glycogène. Des phénomènes analogues de diffusion hormonale dans le milieu ont pu être démontrés sur les gonades par Weniger (1961). Cette constatation est en accord avec le mécanisme probable de l'action sur le foie en culture. Vraisemblablement le produit hormonal n'est pas libéré par une stimulation spécifique, mais diffuse passivement d'une partie de l'explant à l'autre.

Enfin, l'inhibition prolongée de la formation de glycogène indique que le glucagon continue à être élaboré par le pancréas pendant toute la durée de la culture. Il est possible également que le glucagon présent au moment de l'explantation soit protégé de l'inactivation hépatique par la sécrétion éventuelle d'insuline par l'explant, mais la première hypothèse nous paraît plus vraisemblable.

B. - Les îlots B

In vitro, les îlots B ne maintiennent ou n'acquièrent pas en culture une différenciation aussi poussée que celle des îlots A :

— les grains sont rares ou absents ; Ghiani et Orsi (1962) trouvent des grains β dans les ébauches de 12 à 14 jours cultivées ; ce résultat n'est pas en contradiction formelle avec les nôtres qui portent pour la plupart sur des ébauches plus jeunes ;

— nous n'avons pas pu montrer un effet stimulant des parties du pancréas qui contiennent des îlots B, à l'exclusion des îlots A, sur la fonction glycogénique. En effet, il n'est pas possible de démontrer que l'association pancréas-foie stimule plus intensément la formation de glycogène que ne le fait l'association avec un organe quelconque.

En présence de glucose à des concentrations élevées, les granulations β sont apparues en culture. Les cellules B réagiraient à ces concentrations accrues par une élaboration plus intense, mais dans les conditions de la culture, la libération du produit de sécrétion, elle, n'augmenterait pas. Différents auteurs ont obtenu récemment la persistance ou l'apparition de granulations en culture et ont pu démontrer dans certains cas l'élaboration et la libération d'insuline : Wells et Borghese, chez l'embryon de Souris (1961, 1963) ; Schweisthal, Ceas et Wells, chez l'embryon de Rat (1963 *a* et *b*) ; Murrell et Lazarow (1963), Murrell, Morgan et Lazarow (1964) chez l'embryon de Rat ; Takaki, Goldstein et Hiramoto, chez l'embryon de Lapin (1964).

Il s'agit toujours de pancréas de Mammifères ; dans certaines de ces expériences, le milieu de culture contient de la cortisone. Chez le Poulet, les granulations β sont difficiles à faire apparaître *in vitro*, et peut-être certaines hormones sont-elles nécessaires dans le milieu de culture. Par ailleurs, il faut interpréter prudemment les résultats de la coloration à

la fuchsine-paraldéhyde sur les cultures, qu'ils soient positifs ou négatifs. On sait en effet que les groupements colorables par la fuchsine-paraldéhyde accompagnent l'insuline sans faire partie de sa molécule même (Barrnett, Marshall et Seligman, 1955). Takaki, Goldstein et Hiramoto (1964) ont pu montrer que, dans le pancréas d'embryon de Lapin cultivé, il n'y avait pas une correspondance exacte entre les résultats de la coloration par la fuchsine-paraldéhyde et ceux de la méthode aux anticorps fluorescents : pendant les six premiers jours de la culture, il y a une bonne superposition entre les cellules colorées par les deux méthodes ; mais entre 6 et 12 à 15 jours de culture, il y a plus de cellules positives à la fuchsine-paraldéhyde que de cellules colorées par immunofluorescence.

L'ensemble de nos résultats démontre :

1° la présence de grains α à 3 jours et l'activité glycogénolytique de l'ébauche à ce stade ;

2° la présence de grains β à 4 jours.

Les cellules endocrines du pancréas se différencient donc à un stade très précoce. Les données fournies par la littérature sur la présence des hormones pancréatiques dans l'embryon sont différentes. Laissant de côté les observations histologiques, peu cohérentes, nous examinerons les résultats physiologiques. Leibson, Zheludkova et Chilingarian (1961) par la méthode du diaphragme de Rat décèlent l'insuline dans le plasma de l'embryon de 13 jours. Grillo (1961 *b*) par la même méthode trouve de l'insuline dans les extraits de pancréas de 12 jours. Le même auteur (1961 *c*) trouve du glucagon dans les extraits de pancréas de 13 jours, en injectant ces extraits à des embryons jeunes dont le glycogène hépatique est ainsi diminué. Des interventions expérimentales visant à modifier la glycémie ou le glycogène hépatique apportent des indications analogues. Que l'on injecte à de jeunes embryons de l'insuline (Zwilling, 1951, Leibson, 1951, Thommes et Tambornino, 1962) ou du glucagon (Grillo, 1960, 1961 *c*) l'embryon ne rétablit la glycémie ou le glucogène hépatique à un niveau normal qu'à partir de 12 à 15 jours d'incubation. Toutefois, Thommes et Firling (1964) observent la restauration de la glycémie normale par l'embryon de 6 à 10 jours traité au glycagon.

Dans l'ensemble ces résultats indiquent que le contrôle actif du métabolisme des glucides ne s'établit dans l'embryon qu'entre 12 et 15 jours. Les méthodes de dosage biologique décèlent également la présence des hormones pancréatiques à peu près au même âge. Nos résultats indiquent une sécrétion beaucoup plus précoce. Comment expliquer cette divergence ? D'une part la démonstration morphologique de la présence des granulations endocrines ne pouvait être faite qu'à l'échelle ultrastructurale, ce qui n'avait jamais été entrepris. D'autre part, il semble que la méthode physiologique, que nous avons mise au point pour l'étude du

glucagon, soit plus adaptée au niveau de la sécrétion embryonnaire que la méthode employée par Grillo et permette de révéler des quantités d'hormone très faibles. En ce qui concerne l'insuline, rappelons que nous avons observé à l'échelle ultrastructurale une augmentation importante de la quantité des granulations à 12 jours, ce qui peut expliquer que la sécrétion atteigne à ce stade un niveau beaucoup plus élevé, alors décelable par le dosage biologique.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

1° L'étude de l'histogenèse du pancréas chez l'embryon de Poulet a révélé les points suivants :

a) Le tissu insulaire s'isole dès la différenciation de l'ébauche dorsale, au cours du troisième jour d'incubation. Les îlots endocrines A et B sont dès lors principalement localisés dans l'ébauche dorsale. Dans la suite du développement, de petits îlots B apparaissent dans l'ensemble du pancréas. Quant au tissu A, les observations actuelles ne suffisent pas à affirmer qu'il se forme uniquement dans l'ébauche dorsale.

b) Il faut recourir à la technique ultrastructurale pour déceler la différenciation cytologique des cellules embryonnaires. On observe alors des granulations endocrines typiques de très petite taille à des stades précoces :

— granulations α dans l'ébauche dorsale au stade 19 de Hamburger et Hamilton (embryon de 3 jours) ;
— granulations β dans le pancréas de l'embryon de 4 jours.

Il apparaît donc que l'ébauche pancréatique, qui vient de s'isoler, n'est pas constituée de cellules endodermiques banales ; au contraire, le cytoplasme de ces cellules contient déjà des différenciations morphologiques caractéristiques de cellules endocrines pancréatiques.

c) Au moment de l'éclosion, se produit une maturation accélérée des tissus exocrine et endocrine : le cytoplasme acquiert des caractères adultes et une élaboration massive de grains de sécrétion a lieu. A ce stade de différenciation explosive, on trouve des mélanges de grains de sécrétion au sein de certaines cellules :

— dans des cellules de type endocrine, grains α et grains β voisinant dans un cytoplasme commun ;
— dans des cellules de type exocrine, grains Z accompagnés de grains α ou de grains β, ou même les 3 types de granulations présents simultanément.

Il est donc évident que, dans ce matériel, les différents types cellulaires exocrine et endocrine ne forment pas des lignées cellulaires indépendantes.

2° L'aspect morphologique correspond-il à une activité hormonale spécifique ? Nous n'avons pu le démontrer pour les cellules B. Par contre, en ce qui concerne les cellules A sécrétrices de glucagon, nous trouvons que l'ébauche pancréatique dorsale de 3 jours est capable d'inhiber la formation de glycogène dans le foie de 6 jours. Les expériences de contrôle montrent que seul le pancréas, et dans le pancréas, seule la région qui contient les cellules A, exercent cet effet.

La convergence des résultats obtenus par deux méthodes différentes (morphologique et physiologique) permet d'affirmer qu'il s'agit bien d'une élaboration hormonale spécifique, au moins en ce qui concerne le glucagon.

Ces conclusions ne signifient pas que les corrélations hormonales s'établissent dans l'organisme embryonnaire à cette date précoce. Différentes études physiologiques indiquent au contraire que l'embryon ne contrôle activement son métabolisme glucidique qu'à partir de 12-13 jours d'incubation. Il n'y a pas d'incompatibilité entre les deux types de résultats. Il est évident — et il est démontré pour d'autres glandes endocrines — que les cellules glandulaires entrent en fonction bien avant que l'intégration humorale ait lieu dans l'organisme.

RÉSUMÉ

A. — L'étude histologique de la différenciation du pancréas apporte les données suivantes :

1° La glande provient de trois bourgeons endodermiques issus de l'intestin. Ces trois bourgeons fusionnent quelque temps après leur formation (fig. 5 et 6).

2° Le bourgeon dorsal, formé le premier, se développe beaucoup plus vite que les deux autres dans les premiers stades ; il présente dès le début une architecture typique (formations épithéliales compactes ceinturées de capillaires) ; le mésenchyme prend une part réduite à la différenciation de cette région (fig. 3 et 7).

3° Parmi les cellules insulaires, isolées dès le début de l'organogenèse, il devient possible de distinguer les deux types d'îlots à partir du 6e jour. La présence de granulations spécifiques devient évidente à 7 jours dans les îlots A (fig. 12), vers 8-9 jours dans les îlots B. La coloration spécifique des granulations β reste médiocre tout au long de la vie embryonnaire (fig. 17).

4° A partir de 7 à 10 jours, alors que la « branche splénique », endocrine, est déjà bien différenciée, la future glande exocrine commence à se développer : des tubules épithéliaux, issus des canaux excréteurs, s'allongent et se ramifient dans une nappe de mésenchyme lâche qui occupe la courbe de l'anse duodénale (fig. 13). Aux deux régions très distinctes du pancréas, correspondent donc des processus de morphogenèse très différents. Vers 12 jours, de petits îlots B se différencient dans toute la glande à partir de cellules tubulaires. Entre 14 et 17 jours, les tubules primitifs évoluent en acini typiques (fig. 18 et 19).

5° Un dernier processus cytogénétique a lieu dans le pancréas : à partir de 8 jours d'incubation, l'ébauche est le siège d'une leucopoïèse intense ; des granulocytes sanguins se développent en grand nombre à partir des éléments mésenchymateux (fig. 16).

B. — Les critères d'identification des différents types cellulaires endocrine et exocrine ont été ensuite définis à l'échelle ultrastructurale sur le pancréas différencié :

— La cellule endocrine A est caractérisée par des granulations rondes, de 150 à 300 mμ de diamètre, constituées par une substance interne dense aux électrons, enveloppée dans un sac membraneux ; un espace clair sépare le grain interne de l'enveloppe (fig. 25).

— La cellule endocrine B contient des granulations formées de fais-

ceaux d'aiguilles enveloppées dans un sac membraneux large. Ces granulations ont une dimension totale (sac compris) de 400 mμ à 600 mμ (fig. 27).

— La cellule exocrine contient les grains de zymogène : 1 μ à 1,5 μ de diamètre, forme ovale ; leur substance interne est un peu moins dense aux électrons que celle des granulations α ; le grain Z est entouré d'une membrane fine étroitement appliquée, difficile à distinguer (fig. 21). Chez l'embryon de 21 jours, on trouve des grains de « prozymogène » qui présentent des zones inégalement opaques aux électrons dans leur substance interne. Par rapport aux cellules endocrines, les cellules exocrines se distinguent par des différenciations cytoplasmiques importantes : ergatoplasme basal lamellaire, appareil de Golgi à grosses vacuoles, très développé (fig. 22).

— Chez l'embryon de 21 jours également, on trouve, de manière constante, des cellules mixtes ; à la frontière entre les tissus endocrine et exocrine, les cellules présentent toutes les variétés possibles : elles contiennent des grains de zymogène accompagnés soit de grains α, soit de grains β, soit de grains α et de grains β. Ces cellules ont alors un cytoplasme de type exocrine (ergatoplasme développé, grosses mitochondries). On trouve également des cellules endocrines qui présentent un mélange de grains α et β (fig. 29 à 33).

Une fois ces critères établis, l'aspect et l'évolution des granulations spécifiques ont été étudiés au cours de l'organogenèse :

— les premières granulations α ont été trouvées dans l'ébauche pancréatique dorsale de l'embryon de 3 jours (stade 19 de Hamburger et Hamilton) (fig. 45 à 50).

— les premières granulations endocrines β ont été observées dans le pancréas de l'embryon de 4 jours (fig. 61 à 64).

Les deux types de grains endocrines présentent, dès ces jeunes stades, leur morphologie caractéristique. Les grains sont très petits et peu abondants.

— Les premières granulations exocrines ont été observées chez l'embryon de 14 jours.

C. — Les capacités fonctionnelles du pancréas endocrine ont été étudiées en culture organotypique selon la méthode de Wolff et Haffen.

1° Le pancréas, de 3 à 14 jours d'incubation, explanté *in vitro*, survit parfaitement pendant 3 à 7 jours. L'architecture des îlots se maintient ; les granulations α (glucagon) subsistent en culture ; les granulations β (insuline) ne sont obtenues que sur un milieu enrichi en glucose.

2° Dans les conditions de culture, il n'y a pas de différenciation de tissu exocrine. Mais les tubules primitifs persistent correctement si les rapports quantitatifs épithélium-mésenchyme sont maintenus. Par contre, si l'épithélium est explanté avec pas ou peu de mésenchyme, un processus intense de dégénérescence cellulaire envahit l'épithélium tubulaire, qui se creuse de nombreuses cavités (fig. 78 à 80) ; les îlots subsistent.

3° Nous avons cherché quelle est l'influence du pancréas sur le glycogène du foie, lorsque les deux organes sont explantés en parabiose.

— Les expériences préliminaires de culture de foie déterminent le choix du foie de 6 jours cultivé pendant 3 jours. Dans ces conditions, le foie cultivé seul forme, dans la majorité des explants, des quantités appréciables de glycogène.

— Le foie associé au lobe splénique du pancréas de 8 à 14 jours ne contient *jamais* de glycogène : ce résultat démontre l'élaboration de glucagon par les îlots A contenus dans le lobe splénique (fig. 86).

— Au contraire, le foie associé à des fragments des branches ventrales du pancréas est aussi riche ou plus riche en glycogène que le foie cultivé seul (fig. 84 et 85). Mais on ne peut affirmer une influence favorisante spécifique du pancréas dans ce cas, car une association avec un organe quelconque favorise également l'accumulation de glycogène.

— Le pancréas entier, prélevé sur des embryons de 3 à 7 jours d'incubation, se révèle déjà capable d'inhiber la formation de glycogène dans le tissu hépatique.

— La culture à distance, sur un même milieu, du foie et du lobe splénique du pancréas démontre la diffusion du glucagon dans le milieu de culture.

Il y a donc une correspondance chronologique étroite entre les résultats des cultures et la présence de grains α décelables à l'échelle ultrastructurale. Cette correspondance permet de conclure à la différenciation fonctionnelle précoce des cellules A dans l'ébauche dorsale du pancréas de 3 jours.

Institut d'Embryologie Expérimentale
du Centre National
de la Recherche Scientifique
et du Collège de France.
Directeur : Ét. Wolff.

SUMMARY

A) Histogenesis of the chick embryo pancreas proceeds as follows: the gland stems from three endodermal buds grown from the gut (fig. 5 and 6) which fuse soon after their formation. The dorsal bud, the first to develop, grows rapidly in the first stages, showing from the beginning an endocrine architecture (fig. 3 and 7). The two types of islets can be recognized after the 6th day of incubation. α granules become stain able at 7 days (fig. 12), β granules around 8-9 days. The exocrine part of the gland differentiates actively after the 7th day of incubation, through the branching of epithelial tubules in a loose mesenchyme (fig. 13). Extensive leucopoietic processes go on in the mesenchyme of the pancreas during embryonic life (fig. 16).

B) Ultrastructural characteristics of the different cell types are defined as follows :

— A cells have round granules, from 150 to 300 mμ in diameter, bound by a fine membrane, loosely enclosing an electron-dense internal substance (fig. 25).

— B cells granules are made up of sheaves of needles, enveloped in a very loose membranous wrap. The diameter of these structures measures from 400 to 600 mμ (fig. 27).

— Exocrine cells contain zymogen granules, 1 to 1,5 μ in diameter, made up of a medium dense internal substance tightly bound by the external envelope (fig. 21).

— In 21 day old embryos, cells containing mingled granules of different types are frequently encountered (Z granules + α granules ; Z + β ; Z + α + β ; α + β) (fig. 29-33).

Research was made into the initial appearance of the endocrine granules in embryonic stages : α granules are already present in the three day old dorsal primordium (fig. 45-50) ; β granules are first encountered in the 4 day anlage (fig. 61-64) ; when they first appear those granules are very small and rather scarce.

C) Functional activity of the endocrine embryonic pancreas is studied in organotypical culture. Different parts of the pancreas are associated in parabiosis with six day old embryonic liver for three days *in vitro*.

— When cultivated alone, or with pieces of the « ventral pancreases », the liver accumulates glycogen (fig. 84 and 85).

— When associated with the splenic branch of the pancreas from 8 to 14 day old embryos, it *never* contains any glycogen (fig. 86).

This result establishes the production of glucagon by the A islets present in the splenic branch.

— Whole pancreatic anlage, taken from 3 to 7 day embryos, also inhibit glycogen in associated liver.

It is concluded from the chronological agreement between the results of cultures and the ultrastructural study (presence of α granules) that A cells differentiate in the dorsal pancreatic primordium by the end of the third day of incubation.

BIBLIOGRAPHIE

Barnes (B. G.). — 1961. — Ciliated secretory cells in the pars distalis of the mouse hypophysis. *J. Ultrastructur. Research*, **5**, 453-467.

Barrnett (R. J.), Marshall (R. B.) et Seligman (A. M.). — 1955. — Histochemical demonstration of insulin in the islets of Langerhans. *Endocrinology*, U. S. A., **57**, 419-438.

Beaumont (A.). — 1956. — Sur la culture *in vitro* de foie larvaire d'Amphibien : apparition du glycogène en milieu synthétique. *C. R. Acad. Sc.*, **243**, 676-677. — 1957. — Apparition de glycogène en culture *in vitro* de foie larvaire d'Amphibien. *Ibid.*, **245**, 6084-6087. — 1960. — Étude expérimentale de l'apparition du glycogène hépatique chez les larves d'Amphibiens Anoures. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, **94**, 268-395.

Benazzi-Lentati (G.). — 1932. — Sul focolaio eosinofilopoietico del pancreas di Uccelli. *Monitore Zool. Ital.*, **43**, 115-118. — 1933. — Primo contributo allo studio delle isole del Langerhans e della funzione glicogenica del fegato in alcune condizioni sperimentali : azione della insulina. *Ibid.*, **43**, 344-349. — 1934. — Contributo al'istofisiologia delle isole del Langerhans. Ricerche su *Anas domestica*. *Arch. ital. Anat.*, **32**, 322-347.

Bencosme (S. A.) et Pease (D. C.). — 1958. — Electron microscopy of the pancreatic islets. *Endocrinology*, **63**, 1-13.

Black (L.) et Comolli (R.). — 1954. — Sur la différenciation *in vitro* de l'ébauche du pancréas de l'embryon de Poulet. *Arch. Anat. Micr. Morph. Exp.*, **43**, 276-285.

Bot (G.), Andrassy (K. O.) et Kovacs (E. F.). — 1960. — Enzymeiweiss-synthese in Embryonalgewebe *in vivo*. I. Glukose-6-Phosphatase, phosphorylase und Phosphoglukomutase-Bildung in der Leber von Saüger und Gefflügel Embryonen. *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, **17**, 383-389.

Brouha (M.). — 1898 *a*. — Recherches sur le développement du foie, du pancréas, de la cloison mésentérique et des cavités hépato-entériques chez les Oiseaux. *J. de l'Anat. et Physiol.*, **34**, 305-363. — 1898 *b*. — Sur les premières phases du développement du foie et sur l'évolution des pancréas ventraux, chez les Oiseaux. *Anat. Anz.*, **14**, 234-242.

Chen (J. M.). — 1954. — The cultivation in fluid medium of organised liver, pancreas and other tissues of fœtal rats. *Exp. Cell. Res.*, **7**, 518-529.

Choronschitzky (B.). — 1900. — Die Entstehung der Milz, Leber, Gallenblase, Bauchspeicheldrüse und der Pfortadersystems bei den verschiedenen Abteilungen der Wirbeltiere. *Anat. Hefte*, **13**, 369-613.

Clara (M.). — 1924. — Das Pankreas der Vögel. *Anat. Anz.*, **57**, 257-265.

Dalton (A. J.). — 1937. — The functional differentiation of the hepatic cells of the chick embryo. *Anat. Rec.*, **68**, 393-409.

Dieterlen-Lièvre (F.). — 1960. — Influence du pancréas embryonnaire sur la formation du glycogène hépatique chez le Poulet étudiée par la méthode des parabioses *in vitro*. *C. R. Acad. Sci.*, **250**, 1349-1351. — 1963. — Démonstration de l'activité précoce des cellules A du pancréas chez l'embryon de Poulet. *Ibid.*, **256**, 1597-1599.

Doljanski (L.). — 1931. — Sur les cultures pures du foie. *Arch. Exp. Zell forsch.*, **11**, 261-271.

Drukker (J.). — 1961. — *De embryologie van het endokriene apparaat in het pancreas van de kip*, 127 p. N. V. Drukkerij Sigfried, Amsterdam. — 1964. — The cultivation of embryonic chick pancreas. Morphological and physiological aspects. *Acta Morph. Neerl. Scand.*, **5**, 316-328.

Fautrez (J.), Vakaet (L.) et Van Strijthem (N.). — 1960. — L'action antimitotique des stéroïdes cortico-surrénaliens sur le pancréas en culture organotypique. *Rev. franç. Ét. Clin. biol.*, **5**, 608-609.

Felix (W.). — 1892. — Zur Leber und Pankreas Entwicklung. *Arch. Anat. u. Entw.*, 281-323.

Ferreira (D.). — 1957. — L'ultrastructure des cellules du pancréas endocrine chez l'embryon et le Rat nouveau-né. *J. Ultrastr. Res.*, **1**, 14-25.

Gabe (M.). — 1953. — Sur quelques applications de la coloration par la fuchsine-paraldéhyde. *Bull. Micr. appl.*, **3**, 153-162.

Gabe (M.) et Martoja-Pierson (M.). — 1957. — Sur une coloration trichrome en un temps sans différenciation. *Bull. micr. Appl.*, **7**, 60-63.

Ghiani (P.). — 1956. — Evoluzione citologica del pancreas endocrino. Ricerche in embrione di Pollo. *Atti dell'Accad. Ligure Scienze e Lettere*, **13**, 1-16.

Ghiani (P.) et Orsi (L.). — 1962. — Evoluzione del pancreas studiata attraverso la coltura *in vitro*. *Atti Accad. Ligure Scienze e Lettere*, **19**, 3-15.

Gianelli (L.). — 1902. — Ricerche istologiche sul pancreas degli Uccelli. *Monit. Zool. ital.*, **13**, 171-183. — 1908. — Contributo allo studio dello sviluppo del pancreas negli Uccelli. *Ibid.*, **19**, 196-199. — 1913. — Repartizione delle isole di Langerhans nel pancreas degli Uccelli. *Ibid.*, **24**, 107-112.

Gill (P. M.). — 1938. — Effect of endocrine factors on the glycogen of the chick embryo's liver. The effect of adrenaline on embryonic chick glycogen *in vitro* as compared with its effects *in vivo*. *Biochem. J.*, **32**, 1792.

Glauert (A. M.) et Glauert (R. H.). — 1958. — Araldite as an embedding medium for electron microscopy. *J. Biophys. et Biochem. Cytol.*, **4**, 191.

Golosow (N.) et Grobstein (C.). — 1962. — Epitheliomesenchymal interaction in pancreatic morphogenesis. *Developm. Biol.*, **4**, 242-255.

Gomori (G. A.). — 1939. — A differential stain for cell types in the pancreatic islets. *Am. J. Path.*, **15**, 497-499. — 1941. — Observations with differential stains on human islets of Langerhans. *Ibid.*, **17**, 395-405.

Götte (Al.). — 1867. — *Beiträge zur Entwickelungsgeschichte des Darmkanals im Hühnchen*, Tübingen.

Grillo (T. A. I.). — 1960. — Glycogen in the chick embryo and the internal secretions of the pancreas. *Anat. Rec.*, **136**, 202. — 1961 *a*. — The functional differenciation of cells of β chick embryonic pancreas. *Biochem J.* (G. B.), **78**, 18. — 1961 *b*. — The ontogeny of insulin secretion in the chick embryo. *J. Endocrin.*, **22**, 285-292. — 1961 *c*. — The ontogeny of function of the α cells of the pancreas of the chick embryo. *J. Anat.*, **95**, 284. — 1961 *d*. — A histochemical study of phosphorylase in the tissues of the chick embryo. *J. Histochem. Cytochem.*, U. S. A., **4**, 386-391.

Grillo (T. A. I.) et Ozone (K.). — 1962. — Uridine-disphosphate glucose-glycogen synthetase activity in the chick embryo. *Nature*, **195**, 902-903.

Grobstein (C.). — 1964. — Cytodifferenciation and its controls. *Science*, **143**, 643-649.

Guelin-Shedrina (A.). — 1936. — Fonction glycogénique du foie chez l'embryon de Poulet. *C. R. Soc. Biol.*, **121**, 144-146.

Guha (S.) et Wegmann (R.). — 1961. — Phosphorylase in chick-embryo liver. *J. Histochem. Cytochem.*, **9**, 454-455.

Gusek (W.) et Kracht (J.). — 1959. — Elektronen mikroscopische Untersuchungen über Inselwachstum und acino-insulare Transformation. *Frankfurt. Z. Pathol.*, **70**, 98.

Hamburger (V.) et Hamilton (H. L.). — 1951. — A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.*, **88**, 49-92.

Hellman (B.) et Hellerström (C.). — 1960. — The islets of Langerhans in ducks and chickens with special reference to the argyrophil reaction. *Z. Zellforsch. mikr. Anat.*, **52**, 278-290.

Hotchkiss (R. D.). — 1948. — A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. *Arch. Biochem.*, **16**, 131-141.

Kallman (F.) et Grobstein (C.). — 1964. — Fine structure of differentiating mouse pancreatic exocrine cells in transfilter culture. *J. Cell. Biol.*, **20**, 399-414.

Kieny (M.). — 1958. — Contribution à l'étude des besoins nutritifs des tibias embryonnaires d'Oiseau cultivés en milieux naturels et synthétiques. *Arch. Anat. Micr. Morph. exp.*, **47** (1), 86-169.

Kilsheimer (G. S.), Weber (D. R.) et Ashmore (J.). — 1960. — Hepatic glucose production in developing chicken embryo. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, **104**, 515-518.

Kirk (L. K.) et Moscona (A. A.). — 1963. — Synthesis of experimentally induced glutamine synthetase (glutamotransferase activity) in embryonic chick retina *in vitro*. *Developmental Biology*, **8**, 341-357.

Koizumi (H.). — 1963. — Electron microscopy on the pre- and post-natal development of the pancreatic acinar cell of the mouse. *Tohoku J. exp. Med.*, **78**, 58-75.

Lacy (P. E.). — 1957. — Electron microscopy of the normal islets of Langerhans. Studies in the dog, rabbit, guinea pig and rat. *Diabetes*, **6**, 498-507. — 1959. — Electron microscopic and fluorescent antibody studies on islets of Langerhans. *Exp. Cell Res.*, suppl. **7**, 296-308. — 1961. — Electron microscopy of the beta cell of the pancreas. *Am. J. Med.*, **31**, 851-859.

Lee (W. H.). — 1951. — The glycogen content of various tissues in the chick embryo. *Anat. Rec.*, **110**, 465-474.

Leibson (L. G.). — 1951. — Influence de l'insuline sur la teneur en glycogène du foie chez l'embryon de Poulet (en russe). *Fiziol. Zh. SSSR.*, **37**, 343-348. — 1960. — Influence de l'adrénaline sur le contenu glycogénique du foie embryonnaire de Poulet (en russe). *Materiali Po Evoluzionnei Fisiologi*, **4**, 185.

Leibson (L. G.), Zheludkova (Z. P.) et Chilingarian (L. I.). — 1961. — Sécrétion pancréatique d'insuline chez l'embryon de Poulet (en russe). *Bjull. eksper. Biol. Med. SSSR*, **26** (7), 24-27.

Leibson (L. G.), Zheludkova (Z. P.), Pliseckaja (E. M.) et Strabrowsky (E. M.). — 1961. — Modifications des taux de glycogène hépatique et musculaire de l'embryon de Poulet dues à l'insuline injectée dans le sang (en russe). *Fiziol. Zh. SSSR*, **47** (7), 900-905.

LENTATI (G.). — 1930. — Primo contributo allo studio del tessuto endocrino primario del pancreas degli Uccelli. *Rendic. Accad. Naz. Lincei*, **11**, 90-92.
LIÈVRE (F.). — 1957 *a*. — Contribution à l'histogenèse du pancréas endocrine chez l'embryon de Poulet. *Arch. Anat. micr. Morph. exp.*, **46**, 61-80. — 1957 *b*. — La différenciation des cellules A et B des îlots endocriniens du pancréas chez l'embryon de Poulet. *Ann. Endocr.*, **18**, 592-597.
LÖVLIE (A. M.). — 1959. — On the functional differentiation of the hepatic cells of the chick embryo : glycogen synthesis and mitotic activity. *Nytt mag. Zool.*, Norge **8**, 5-23.
LUFT (J.). — 1961. — Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **9**, 409-414.
MAILLARD (M.). — 1963. — Origine des grains de sécrétion dans les cellules de l'antéhypophyse embryonnaire du Rat : rôle de l'appareil de Golgi. *J. Microsc.*, **2**, 81-94.
MOSCONA (A. A.) et HUBBY (J. L.). — 1963. — Experimentally induced changes in glutamotransferase activity in embryonic tissue. *Develop. Biol.*, **7**, 192-206.
MUNGER (B. L.). — 1958. — A phase and electron microscopic study of cellular differentiation in pancreatic acinar cells of the mouse. *Am. J. Anat.*, **103**, 1-34. — 1958. — A light and electron microscopic study of cellular differentiation of the pancreatic islets of the mouse. *Am. J. Anat.*, **103**, 275-311. — 1962. — The secretory cycle of the pancreatic α cell : an electron microscopic study of normal and synthalin-treated rabbits. *Lab. Inv.*, **11**, 8885-8901.
MURRELL (L. R.) et LAZAROW (A.). — 1963. — Organ cultures of fetal endocrine rat pancreas on liquid medium. *Anat. Rec.*, **145**, 264.
MURRELL (L. R.), MORGAN (C. R.) et LAZAROW (A.). — 1964. — *Insulin synthesis by organ cultured rat islet tissue.* 15th Ann. Meet. Tissue culture Assoc., Baltimore, Abstract, 1.
NAGELSCHMIDT (L.). — 1939. — Untersuchungen über die Langerhanschen Inseln der Bauchspeicheldrüse bei den Vögeln. *Mikrosk. Anat. Forsch.*, **45**, 200-232.
MIAHLE (P.). — 1958. — Glucagon, insuline et régulation endocrine de la glycémie chez le Canard. *Acta endocr.*, suppl. **36**, 1-134.
NORDMANN (M.). — 1929. — Wachstum und Stoffwechsel der Leberzellen in der Gewebskultur. *Arch. Exp. Zellf.*, **8**, 371-414.
NASS (M. H. K.) et NASS (S.). — 1962. — Fibrous structures within the matrix of developing chick embryo mitochondria. *Exp. Cell Res.*, **26**, 424.
O'CONNOR (R. J.). — 1953. — Metabolism and glycogen formation in the liver of the chicken embryo. *J. Embryol. Exp. Morph.*, **1**, 105-114.
PALADE (G. E.). — 1952. — A study of fixation for electron microscopy. *J. Exp. Med.*, **95**, 285.
PENSA (A.). — 1917. — Lo sviluppo del pancreas negli Uccelli. *Arch. It. anat. embryol.*, **25**, 331.
PIPAN (N.). — 1960. — Licht und Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Differenzierung des embryonalen Pankreas der Maus. *Z. Zellforsch. mikr. Anat.*, **52**, 291-314.
POTVIN et ARON. — 1927. — Recherches sur l'évolution embryonnaire des îlots pancréatiques endocrines chez le Poulet. *C. R. Soc. Biol.*, **96**, 267-269.
REMAK. — 1854. — *Untersuchungen über die Entwicklung der Wirbeltiere*, Berlin.
RIMNICEANU (C.), MICLEA (G.) LUNGULESCU-DRAGAN (M.). — 1955. — Glicogeneze in cursul dez voltarii embrionului de gainea. *Bul. Sti., Sect. Sti. Med. Rom.*, **7**, 959-980.
SAINT-RÉMY (G.). — 1893. — Recherches sur le développement du pancréas chez les Oiseaux. *Rev. Biol. Nord France*, **5**, 449-457.
SAMES (G. L.) et LEATHEM (J. H.). — 1952. — Influence of adrenal steroids on chick embryos. *Anat. Rec.*, **113**, 568.
SCHWEISTHAL (M. R.), CEAS (M. L.) et WELLS (L. J.). — 1963 *a*. — Development of the pancreas of the rat embryo *in vitro* : islets and acini. *Anat. Rec.*, **147**, 149-162. — 1963 *b*. — Pancreatic islets of the rat embryo : development in organ culture. *Diabetes*, **12**, 373.
SIWE (St. A.). — 1927. — Pankreasstudien. *Morphol. Jahrb.*, **57**, 84-307.
SJÖSTRAND (F. S.). — 1962. — Critical evaluation of ultrastructural patterns with respect to fixation. In : The interpretation of ultrastructure. *Symp. of the Int. Soc. Cell. Biol.*, **1**, 47-68.
SJÖSTRAND (F. J.) et HANZON (V.). — 1954 *a*. — Membrane structure of cytoplasm and mitochondria in exocrine cells of mouse pancreas as revealed by high reso-

lution electron microscopy. *Exp. Cell Res.*, **7**, 393-414. — 1954 *b*. — Ultrastructure of Golgi apparatus of exocrine cells of mouse pancreas. *Exp. Cell Res.*, **7**, 415-429.

Sorokin (S.). — 1962. — Centriole and the formation of rudimentary cilia by fibroblasts and smooth muscle cells. *J. Cell Biol.*, **15**, 363-377.

Sotelo (J. R.) et Trujillo Cenoz (O.). — 1958. — Electron microscope study on the development of ciliary components of the neural epithelium of the chick embryo. *Z. Zellforsch. u. mikr. Anat.*, **49**, 1-12.

Takaki (R.), Goldstein (M.) et Hiramoto (R.). — 1964. — *Study of islet cells in organ culture of fetal and newborn rabbit pancreas.* 15th Ann. Meet. Tissue Culture Ass., Baltimore, Abstract, 2.

Thommes (R. C.). — 1960. — A histochemical study of insulin in the chick embryo pancreas. *Growth.*, **24**, 69-80.

Thommes (R. C.) et Firling (C. E.). — 1964. — Blood glucose and liver glycogen levels in glucagon-treated chick embryos. *Gen. and Comp. Endocr.*, **4**, 1-8.

Thommes (R. C.) et Tambornino (A.). — 1962. — Effects of insulin administration upon blood-glucose levels of the chick embryo. *Physiol. Zool.*, **35**, 256-262.

Van Campenhout (E.) et Cornelis (G.). — 1953. — Les îlots endocrines du pancréas des Oiseaux. *C. R. Assoc. Anat.*, **79**, 462-466.

Van Strijthem (N.). — 1960. — La culture organotypique du pancréas du souriceau nouveau-né : influence de stéroïdes surrénaliens. *Ann. Soc. Roy. Zool. Belg.*, **90**, 79-82.

Verne (J.) et Hébert (S.). — 1963 *a*. — Action du glucagon sur les hépatocytes en culture. *C. R. Soc. Biol.*, **157**, 984-986. — 1963 *b*. — Culture d'hépatocytes en présence d'insuline, de cortisone et d'adrénaline. *Ibid.*, **157**, 1924.

Villamil (M. F.). — 1942. — Citogenesis del pancreas exo y endocrino en embriones de pollo. *Revista de la Soc. argentina de Biol.*, **18**, 416-429.

Vuylsteke (C. A.) et de Duve (C.). — 1953. — Le contenu en glucagon du pancréas aviaire. *Arch. Internat. Physiol.*, **61**, 273-274. — 1955. — Augmentation de l'effet du glucagon par un facteur présent dans les préparations d'insuline. I. Spécificité du phénomène. II. Nature du phénomène. *J. de Physiol.*, **47**, 304-308, 308-310.

Watson (M. L.). — 1958. — Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **4**, 475-478.

Wells (L. J.) et Borghese (E.). — 1961. — Sviluppo embrionale *in vitro* del pancreas di topo. *Boll. Zool. Ital.*, **28**, 235-239. — 1963. — Development of the pancreas of the mouse embryo *in vitro* : acini and islets. *Gen. Comp. Endocrinol.* **3**, 265-273.

Weniger (J. P.). — 1961. — Activité hormonale des gonades morphologiquement indifférenciées de l'embryon de Poulet. *Arch. Anat. micr. Morph. exp.*, **50**, 269-288.

Weston (J. C.). — 1956. — The effect of cortisone on some chemical constituents of developing chick liver. *Growth.*, **20**, 75-90.

Williamson (J. R.), Lacy (P. E.) et Grisham (J. W.). — 1961. — Ultrastructural changes in islets of the Rat produced by tolbutamide. *Diabetes*, **10**, 460-469.

Winborn (W. B.). — 1963. — Light and electron microscopy of the islets of Langerhans of the Saimiri Monkey pancreas. *Anat. Rec.*, **147**, 65-94.

Wolff (Et.), Haffen (K.). — 1952. — Sur le développement et la différenciation sexuelle des gonades embryonnaires d'Oiseau en culture *in vitro J. exp. Zool.*, **119**, 381-404

Wolff (Et.), Haffen (K.) et Dieterlen (F.). — 1960. — Influence des états nutritionnels sur la différenciation et le fonctionnement des glandes endocrines embryonnaires. *Ann. Nutrit. Alim.*, **14**, 11-20.

Zagury (D.). — 1961. — Contribution à l'étude morphologique des sécrétions pancréatiques chez le Rat. *Ann. Sci. Nat., Zool. Biol. anim.*, **3**, 185-296.

Zeigel (R. F.). — 1962 *a*. — Cytogenic study of embryonic chick pancreas. I. Exocrine tissue. *J. Nat. Cancer Inst.* (U. S. A.), **28** (2), 269-303. — 1962 *b*. — On the occurrence of cilia in several cell types of the chick pancreas. *J. Ultrastr. Res.*, **7**, 286-292.

Zeigel (R. F.) et Dalton (A. J.). — 1962. — Speculations based on the morphology of the Golgi systems in several types of protein-secreting cells. *J. Cell Biol.*, **15**, 45-54.

Zwilling (E.). — 1951. — Carbohydrate metabolism in insulin-treated chick embryos. *Arch. Biochem. and Biophys.*, **33**, 228-242.

Le Directeur de la Publication : Pierre-P. Grassé.

Dépôt légal : 1965. 2e trimestre. N° d'ordre 1.
Imprimerie Barnéoud S. A. Laval — N° 5051. — 5-1965.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Le rôle de la surrénale dans le métabolisme glucidique chez l'embryon d'Oiseau et de Mammifère.

Vu et approuvé :

Paris, le 17 novembre 1964.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Marc ZAMANSKY.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean ROCHE.

dépôt légal : 1965, 2e trimestre, n° d'ordre 1.
imprimerie barnéoud s. a. laval. — n° 5051. — 5-1965.